

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 100 32 379.0  
**Anmeldetag:** 06. Juli 2000  
**Anmelder/Inhaber:** Aventis CropScience GmbH,  
Frankfurt am Main/DE  
**Bezeichnung:** Promotoren zur Genexpression in Karyopsen von  
Pflanzen  
**IPC:** C 12 N, A 01 H

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 26. April 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

**Faust**

## Beschreibung

## 5 Promotoren zur Genexpression in Karyopsen von Pflanzen

Die vorliegende Erfindung betrifft Promotoren, die eine karyopsenspezifische Expression von ihnen kontrollierter codierender Nucleotidsequenzen bewirken, die zur gewebespezifischen Genexpression in Pflanzen geeignet sind,

10 Expressionskassetten, rekombinante Vektoren und Wirtszellen, die solche Promotoren enthalten, damit transformierte transgene Pflanzenzellen und Pflanzen, sowie Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen.

Nachfolgend werden Dokumente aus dem Stand der Technik zitiert, deren

## 15 Offenbarungsgehalt hiermit durch Referenz Teil dieser Anmeldung ist.

Der Einsatz von Pflanzen, die mit Hilfe gentechnischer Verfahren in ihrem Erbgut verändert wurden, hat sich in vielen Bereichen der Landwirtschaft als vorteilhaft erwiesen, um bestimmte Eigenschaften auf Nutzpflanzen zu übertragen. Die

20 vornehmlichen Ziele sind vor allem Pflanzenschutz und zum anderen eine Qualitäts- und Ertragssteigerung der erntbaren Produkte.

Zahlreiche Verfahren zur genetischen Modifikation dikotyler und monokotyler Pflanzen sind bekannt (vgl. u.a. Gasser und Fraley, Science 244 (1989), 1293-1299; Potrykus, Ann. Rev. Plant Mol. Biol. Plant Physiol. 42 (1991), 205-225). Oft basieren diese auf der Übertragung von Genkonstrukten, die in den meisten Fällen Kombinationen von bestimmten codierenden Regionen von Strukturgenen mit Promotorregionen derselben oder anderer Strukturgene, sowie

Transkriptionsterminatoren darstellen.

Die Bereitstellung von Promotoren ist im Zusammenhang mit der Expression von Strukturgenen von großer Bedeutung für die Herstellung von transgenen Pflanzen, da die Spezifität eines Promotors ausschlaggebend dafür ist, zu welchem Zeitpunkt, in welchen Gewebetypen unter welchen physiologischen Bedingungen und mit

5 welcher Intensität ein transferiertes Gen in der modifizierten Pflanze exprimiert wird.

Die Initiation und Regulation der Transkription unterliegt dem als Promotor bezeichneten DNA-Abschnitt eines Gens. In der Regel liegen Promotorsequenzen im 5'-flankierenden Bereich eines transkribierten Gens. Einzelne Elemente eines Promotors (z.B. transkriptionelle Enhancer) können unter Umständen auch im 3'-flankierenden Bereich oder innerhalb von Intron-Sequenzen eines Gens lokalisiert sein (Kuhlemeier (1992) Plant Mol. Biol. 19: 1-14; Luehrsen (1994) The Maize Handbook, 636-638).

Eine Vielzahl von Promotoren, die die Expression von transferierten Genen oder Strukturgenen in Pflanzen steuern können, ist bereits bekannt. Der am häufigsten verwendete Promotor ist der 35S CaMV-Promotor (Franck et al., Cell 1 (1980), 285-294), der zu einer konstitutiven Expression des eingeführten Gens führt. Häufig werden auch induzierbare Promotoren eingesetzt, beispielsweise zur Wundinduktion (DE-A-3843628), chemischen Induktion (Ward et al., Plant Molec. Biol. 22 (1993), 361-366) oder Lichtinduktion (Fluhr et al., Science 232 (1988), 1106-1112).

Auch die Verwendung zell- und gewebespezifischer Promotoren wurde beschrieben: schließzellenspezifische (DE-A-4207358), samen-, knollen- und fruchtspezifische (zusammengefasst in Edwards and Coruzzi, Annu. Rev. Genet. 24 (1990), 275-303; DE-A-3843627), phloemspezifische (Schmülling et al., Plant Cell 1 (1989), 665-670), wurzelknöllchenspezifische (DE-A-3702497) oder meristemspezifische Genexpression (Ito et al., Plant Mol. Biol. 24 (1994), 863-878).

Die Verwendung der beschriebenen Promotoren ist oft mit Nachteilen verbunden. Promotoren, die eine konstitutive Expression der von ihnen kontrollierten Gene bewirken, können beispielsweise zur Erzeugung herbizidtoleranter und pathogenresistenter Pflanzen eingesetzt werden, haben aber den Nachteil, daß die Produkte der von ihnen kontrollierten Gene in allen Teilen der Pflanze vorliegen, was unerwünscht sein kann, z.B. wenn die Pflanzen der Ernährung dienen sollen. Ein negativer Aspekt der gewebe- und/oder entwicklungsunabhängigen Expression eines Transgens kann außerdem in einer unerwünschten Wirkung auf die Pflanzenentwicklung bestehen. Induzierbare Promotoren sind gleichfalls mit Nachteilen verbunden, da die Induktionsbedingungen bei landwirtschaftlich genutzten Pflanzen im Freiland typischerweise schwer kontrollierbar sind.

Darüberhinaus ist es zur Bewältigung verschiedener Ansätze der genetischen Veränderung von Pflanzen erforderlich, Gene, die unterschiedlich reguliert werden sollen, unter die Kontrolle verschiedener Promotoren zu stellen. Es ist daher notwendig, verschiedene Promotorsysteme mit unterschiedlicher Spezifität zur Verfügung zu stellen.

Die kontrollierte Expression von Transgenen ist zum Beispiel für das Einbringen von Resistenzeigenschaften oder die Modifikation von Stoffwechselvorgängen in Pflanzen von großem Nutzen. Soll ein Transgen in definierte Stoffwechselwege einer Pflanze eingreifen, z.B. einen neuen Inhaltsstoff produzieren oder vor Pathogenbefall schützen, ist seine räumlich und/oder zeitlich kontrollierte Expression nur unter Verwendung eines induzierbaren und/oder gewebe- und/oder entwicklungsspezifischen Promotors möglich. Erst dadurch wird die gezielte Produktion von erwünschten Inhaltsstoffen in einem definierten Entwicklungsstadium oder Gewebe der Pflanze ermöglicht. Z. B. kann für die Anwendung der Antisense-Technologie, in der die Expression von pflanzeneigenen Genen verhindert werden soll, der Einsatz von gewebe- und/oder entwicklungsspezifischen Promotoren gegenüber einer gewebe- und/oder entwicklungsunabhängigen Expression von

Vorteil sein: Der Antisense-Effekt tritt so genau in dem Entwicklungsstadium bzw. Gewebe der Pflanze auf, in dem auch das pflanzeneigene Gen exprimiert wird.

Promotoren, die die Genexpression in der Karyopse regulieren sind bisher nur in begrenzter Zahl bekannt. Zur Bewältigung bestimmter Ansätze der genetischen Veränderung von Pflanzen ist es erforderlich, alternative Promotorsysteme zur Genexpression in der Karyopse zur Verfügung zu stellen, die im Vergleich zu den bekannten Systemen unterschiedlich reguliert sind.

Aus verschiedenen Pflanzenspezies wurden Gene der Stärkesynthese isoliert, deren Genprodukte spezifisch im Speichergewebe der Karyopse, nicht aber in vegetativen Geweben exprimiert werden, z.B. entsprechende Gene bzw. cDNA-Klone der GBSS I. Dazu gehört der waxy Locus aus Mais (Klößgen *et al.* (1986) Mol. Gen. Genet. 203: 237-244), sowie aus Gerste (Rohde *et al.* (1988) Nucleic Acid Research 16, No. 14: 7185-7186), Reis (Wang *et al.* (1990) Nucleic Acid Research 18: 5898), Kartoffel (van der Leij *et al.* (1991) Mol. Gen. Genet. 228: 240-248), Erbse (Dry *et al.* (1992) Plant J. 2: 193-202), Maniok (Salehuzzaman *et al.* (1993) Plant Mol. Biol. 20: 947-962), Hirse (Hsing *et al.* (1995) Acc.Nr. U23954) und Zuckerrohr (Schneider *et al.* (1999) Mol. Gen. Genet. 262: 515-524).

Auch aus Weizen wurde bereits eine waxy-cDNA isoliert und sequenziert (Clark *et al.* (1991) Plant Mol. Biol. 16: 1099-1101; Ainsworth *et al.* (1993) Plant Mol. Biol. 22: 67-82). Ein weiterer Klon der GBSS I wurde aus einer cDNA-Bank von ca. 20 Tage alten Weizenkaryopsen isoliert (Block (1997) "Isolierung, Charakterisierung und Expressionsanalysen von Stärkesynthese-Genen aus Weizen" (*Triticum aestivum* L.), Dissertation, Universität Hamburg).

Während inzwischen drei homologe waxy Strukturgene, die auf den Chromosomen 7A, 4A und 7D des hexaploiden Weizens liegen, isoliert wurden (Murai *et al.* (1999) Gene 234: 71-79), sind die Promotorsequenzen dieser oder anderer genomischer Klone aus Weizen bisher unbekannt. Bekannt sind lediglich die 5'-flankierenden

Bereiche der GBSS I aus Gerste (GenBank Acc.No. X07931), Löwenmäulchen (GenBank Acc.No. AJ06294), Reis (GenBank Acc.No. AB008794, AB008795), Kartoffel (GenBank Acc.No. X58453) und Mais (GenBank Acc.No. X03935).

5 Ein cDNA-Klon einer stärkekomplexierten Stärkesynthase vom Typ II (GBSS II), die nicht im Endosperm, sondern nur in Blättern und im Perikarp von Weizen exprimiert wird, konnte kürzlich isoliert werden (Vrinten & Nakamura (2000) Plant Physiol. 122: 255-263). In diploidem Weizen (*Triticum monococcum* L.) wurde außerdem auf Proteinebene eine 56kDa große Isoform einer GBSS beschrieben (Fujita & Taira (1998) Planta 207: 125-132). Diese Isoform kann im Perikarp, Aleuron und Embryo von unreifen Karyopsen nachgewiesen werden.

10 Darüber hinaus sind neben der GBSS I-Gene auch codierende Sequenzen einer Stärkesynthase des Typ II aus einer karyopsenspezifischen cDNA-Bank isoliert worden (Walter *et al.* (1997), WO 97/45545, EMBL Datenbank U66377), deren karyopsenspezifische Expression nachgewiesen wurde (Walter *et al.* (1999) Analysis of starch synthase II from wheat; In: Genetic Tailoring of Novel Starch Polymers, 16.-20. September 1999, Carry-le-Rouet, Frankreich). In Northern-Analysen wurde gezeigt, daß die Transkripte der GBSS I (Block (1997) Dissertation, Universität Hamburg) und der SS II (Walter *et al.*, in Vorbereitung) in frühen Entwicklungsstadien der Karyopse, aber nicht im assimilierenden Blattgewebe auftreten.

25 Weitere cDNA-Sequenzen von Stärkesynthasen des Typ II wurden außerdem aus Mais (zSSIIa und zSSIIb; Ham *et al.* (1998) Plant Mol. Biol. 37: 639-649), Erbsen (Dry *et al.* (1992) Plant J. 2: 193-202), Kartoffel (Edwards *et al.* (1995) Plant J. 8: 283-294) und Süßkartoffel (Ham *et al.* (1998) Acc. Nr. AF068834) isoliert.

30 Drei cDNA-Sequenzen der SS II aus Weizen (*T. aestivum* cv "Chinese Spring"; wSSII-A1, wSSII-B1, wSSII-D1) wurden ferner aus einer endospermspezifischen cDNA-Bank isoliert (Li *et al.*, (1999) Plant Phys. 120: 1147-1155). Mittels PCR-

Analysen wurde jeder der drei Klone einem Genom des hexaploiden Weizens zugeordnet. In Western-Blot Analysen konnte gezeigt werden, daß das 100kDa Protein (SGP-B1) in frühen Stadien der Endospermentwicklung sowohl stärkekomplexiert, als auch in löslichen Form vorliegt.

5 Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Mittel bereitzustellen, die eine gezielte karyopsenspezifische Genexpression in genetisch modifizierten Pflanzen ermöglichen, vorzugsweise in monokotylen Pflanzen.

10 Durch den Einsatz der erfindungsgemäßen Mittel wird ein gewebe- und/oder entwicklungsspezifisch definierter Eingriff z.B. in die Biosynthese von Speicherstärke oder die Nutzung der Karyopse als Speicher- oder Syntheseorgan für andere Reservestoffe als Stärke (z.B. biologische Kunststoffe) ermöglicht.

15 Unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen Promotorsequenzen können somit Gene während der Kommentwicklung von Getreiden spezifisch und zu einem frühen Zeitpunkt in der Karyopse exprimiert werden.

20 Die erfindungsgemäßen Promotoren ermöglichen so beispielsweise gezielte Veränderungen in der Speicherstärke: Um eine möglichst vielfältige Anwendung von Stärke für die unterschiedlichsten industriellen Bedürfnisse zu ermöglichen, ist es wünschenswert Pflanzen bereitzustellen, die Stärken mit definierten Eigenschaften synthetisieren können. So werden z.B. für die verarbeitende Industrie entscheidende Eigenschaften wie Löslichkeit, Verkleisterungsverhalten, Retrogradierungstendenz,

25 Viskosität und Komplexiervermögen durch das Verhältnis von Amylose und Amylopektin zueinander, dem Verzweigungsgrad des Amylopektins und die Derivatisierung der Polymere bestimmt. Eine gezielte Modifizierung solcher Eigenschaften ersetzt aufwendige Verfahren zur Trennung von Amylose und Amylopektin oder die kostspielige chemische Modifizierung von Stärke.

Eine begrenzte Möglichkeit, solche Pflanzen zu erhalten, besteht in der Anwendung klassischer Züchtungsmethoden. Durch Kreuzung spontan auftretender Mutanten gelang so zum Beispiel die Herstellung eines (amylosefreien) "waxy" Weizens (Nakamura *et al.* (1995) Mol. Gen. Genet. 248: 253-259). Aufgrund des polyploiden Charakters des kommerziell bedeutenden Brot-Weizens sind Mutationen welche die Stärkestruktur betreffen nicht leicht zu erkennen, da sie von intakten Allelen kompensiert werden. Die Anwendung klassischer Züchtungsmethoden erweist sich daher als schwierig. Außerdem kann nur auf bereits vorhandene Enzymaktivitäten zurückgegriffen werden. Neue Aktivitäten, die bisher nicht in Pflanzen identifiziert wurden oder die in Pflanzen (oder anderen Organismen) identifiziert wurden, die nicht mit der Zielpflanze kreuzbar sind, können ebenfalls nicht mit Hilfe züchterischer Verfahren bearbeitet werden.

Eine Alternative besteht in der gezielten Modifikation stärkeproduzierender Pflanzen durch gentechnische Methoden. Voraussetzung hierfür ist jedoch neben der Identifizierung und Isolierung von Genen, deren Genprodukte an der Stärkesynthese und/oder Stärkemodifikation beteiligt sind, der Einsatz spezifischer Promotoren, die eine gewebe- und/oder entwicklungsspezifische Expression der von ihnen kontrollierten Gene in den stärkebildenden Geweben vermitteln.

Durch den Einsatz der erfindungsgemäßen Promotorsequenzen könnten außerdem auch solche Gene eingebracht werden, die dem Getreideendosperm eine modifizierte Funktion als Speichergewebe für andere Speicherstoffe verleihen.

Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen charakterisierten Ausführungsformen gelöst.

Es wurde nun gefunden, daß überraschenderweise ein Promotor wie nachfolgend definiert in Pflanzen eine karyopsenspezifische Expression einer von ihm kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirkt.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Nucleinsäuremolekül mit der Funktion eines karyopsenspezifischen Promotors, das

a) ein oder mehrere Sequenzelemente umfaßt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Nukleotiden 1736-1764 der Seq ID No. 1; 1885-1906 der Seq ID No. 1; 1937-2011 der Seq ID No. 1; 2115-2140 der Seq ID No. 1; 2306-2319 der Seq ID No. 1; 2940-2963 der Seq ID No. 1 und 3012-3029 der Seq ID No. 1;

b) die durch Seq ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 definierte bzw. durch DSM 13398 (Plasmid p 11/1) oder DSM 13397 (Plasmid p 8/C) hinterlegte Nucleinsäuresequenz umfaßt;

c) einen funktionalen Teil einer der in b) genannten Nucleinsäuresequenz umfaßt;

d) eine Sequenz umfaßt, die mit mindestens einer der in b) genannten Nucleinsäuresequenzen hybridisiert; und/oder

e) eine Sequenz umfaßt, die mit einer der in b) genannten

Nucleinsäuresequenzen zu mindestens 60 %, vorzugsweise zu mindestens 75 %, insbesondere zu mindestens 90 % und ganz besonders bevorzugt zu mindestens 95% identisch ist.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die Begriffe „erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül“ und „erfindungsgemäßer Promotor“ als Synonyme verwendet.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Promotoren solche von pflanzlichen Genen, vorzugsweise monokotyler Pflanzen, oder von solchen abgeleitet. In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Promotoren zur Expression in monokotylen Pflanzen und/oder zur Expression von Stärkesynthase-Genen geeignet. Die erfindungsgemäßen Promotoren können hierbei aus pflanzlichen Genen stammen, durch rekombinante DNA-Techniken modifiziert sein und/oder synthetisch hergestellt werden.

Die erfindungsgemäßen Promotoren können z.B. modifiziert werden, indem sie mit anderen *cis*-regulatorischen Elementen kombiniert werden. So können die

Promotoren zusätzlich mit anderen Enhancer-Elementen kombiniert werden, um die Expression des korrespondierenden Nucleinsäuremoleküls zu verstärken, ohne seine gewebespezifische Expression zu beeinflussen. Auch individuelle *cis*-Elemente der isolierten Promotoren können ebenfalls zu regulatorischen Einheiten miteinander kombiniert werden.

5 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem "Promotor" eine DNA-Sequenz verstanden, die den regulatorischen Anteil eines Gens, vorzugsweise eines Strukturgens, umfaßt. Unter dem "regulatorischen Anteil" eines Gens wird derjenige Anteil verstanden, der die Expressionsbedingungen des Gens bestimmt. Ein regulatorischer Anteil besitzt ein Sequenzmotiv, an dem Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase assemblieren und die Transkription des codierenden Anteils des Gens einleiten. Darüber hinaus kann der regulatorische Anteil ein oder mehrere positive regulatorische Elemente, sogenannte Enhancer umfassen. Er kann zusätzlich oder an deren Stelle aber auch negativ regulatorische Elemente, sogenannte Silencer enthalten. Unter einem "Strukturgen" wird im allgemeinen eine genetische Einheit aus regulatorischem und codierendem Anteil verstanden, deren Genprodukt im allgemeinen ein Protein ist. Die Information für die primäre Aminosäuresequenz des Genprodukts ist im codierenden Anteil des Strukturgens enthalten, während der regulatorische Anteil bestimmt, wann, in welchen Geweben, unter welchen physiologischen Bedingungen und in welchen Mengen das Transkript des codierenden Anteils gebildet wird, nach dessen Vorlage das Genprodukt synthetisiert wird.

25 Unter dem Begriff "karyopsenspezifisch" versteht man im Rahmen der vorliegenden Erfindung, daß ein unter der Kontrolle eines erfindungsgemäßen Promotors stehendes Gen in der Karyopse exprimiert wird, vorzugsweise zu einem frühen Zeitpunkt, d.h. < 15 dap (dap = Tage nach der Befruchtung), vorzugsweise < 10 dap, insbesondere etwa 5 dap. Insbesondere ist Karyopsenspezifität im Rahmen der vorliegenden Erfindung dann gegeben, wenn der erfindungsgemäße Promoter die Expression eines Gens in der Karyopse im Vergleich zu anderen Geweben wie z.B.

maturen Blättern oder Wurzeln begünstigt und in der Karyopse eine signifikante Erhöhung, d.h. mindestens 2- bis 5-fache, vorzugsweise 5- bis 10-fache, insbesondere 10- bis 100fache oder höhere Expression bewirkt.

5 Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kann Karyopsenspezifität z.B. durch übliche Reporter-Experimente analysiert werden. Zur Testung einer isolierten Promotorsequenz auf deren Promotoraktivität in Karyopse kann der Promotor beispielsweise in einer Expressionskassette bzw. in einen Vektor zur Pflanzentransformation operativ mit einem Reporter-Gen, wie z.B. dem  $\beta$ -Glucuronidasegen aus *E. coli*, verknüpft werden. Dieses Konstrukt wird dann zur Transformation von Pflanzen verwendet. Anschließend wird die Expression der  $\beta$ -Glucuronidase in der Karyopse im Vergleich zu anderen Geweben, wie z.B. maturen Blättern oder Wurzeln bestimmt, wie z.B. bei Martin et al. (The GUS Reporter System as a Tool to Study Plant Gene Expression, In: GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression, Academic Press (1992), 23-43) beschrieben.

15 Der Begriff "Karyopse" ist dem Fachmann geläufig und umfaßt insbesondere Perikarp und Endosperm. Da diese Gewebe eine dynamische Entwicklung durchlaufen, korreliert z.B. die Entwicklung des Endosperms in verschiedene Zell- oder Gewebetypen mit unterschiedlichen biochemischen Aktivitäten, bedingt durch eine differenzielle Genexpression. Ergänzend sei auf Strasburger verwiesen (Lehrbuch der Botanik für Hochschulen: Begr. v. Eduard Strasburger u. a. Neubearb. v. Peter Sitte, Hubert Ziegler u. a., 34. Aufl., 1998, Fischer (Gustav)-Verlag, Stuttgart).

25 Der erfindungsgemäße Promotor erlaubt eine karyopsenspezifische Genexpression einer von ihm kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz. Er stellt eine interessante Alternative zu bekannten Promotoren dar, weil er auch die Genexpression im Perikarp vermitteln kann und darüber hinaus bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Karyopse aktiv ist, d.h. < 15 dap, vorzugsweise < 10

dap, insbesondere etwa 5 dap. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Promotors kann insbesondere die Expression von solchen Genen effektiv gesteuert werden, deren Genprodukte am Stärkemetabolismus in monokotylen Pflanzen und insbesondere Weizen beteiligt sind.

5

Vielfältige Verwendungsmöglichkeiten stehen für die erfindungsgemäßen Promotoren zur Verfügung. Beispielsweise wird die Herstellung transgener Pflanzen ermöglicht, die aufgrund eines modifizierten Metabolismus in der Karyopse eine qualitativ und/oder quantitativ veränderte Speicherstoffzusammensetzung in ihrem Speichergewebe, d.h. im Getreidekorn aufweisen.

10

Neben einem Promotor, der die gesamte durch SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 definierte Sequenz, bzw. die entsprechend durch DSM 13398 oder DSM 13397 hinterlegte Sequenz aufweist, betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotoren, die einen funktionalen Teil dieser Sequenz aufweisen und die in Pflanzen eine karyopsenspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken.

15

Unter einem "funktionalen Teil" versteht man im Rahmen der vorliegenden Erfindung solche Sequenzen, welche nicht die vollständige Sequenzen der besagten Promotoren, wie durch SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 definiert, bzw. durch DSM 13398 oder DSM 13397 hinterlegt, umfassen und trotz dieser Abweichung die erfindungsgemäße Karyopsenspezifität besitzen.

20

Ein Maß für die Promotoraktivität ist beispielsweise die für ein bestimmtes Markergen, das unter der regulativen Kontrolle des erfindungsgemäßen Promotors steht, ermittelte Expressionsrate. Beispiele für geeignete Markergene sind das  $\beta$ -Glucuronidase-(GUS)-Gen aus *E. coli* (Jefferson (1987) Plant Molecular Biology Reporter Vol.5 (4): 387-405) oder das Green-Fluorescence-Protein-(GFP)-Gen (Baulcombe et al., Plant J. 7 (16) (1993), 1045-1053). Die Organ- bzw. Gewebespezifität läßt sich leicht durch Vergleich der an einzelnen Geweben bzw.

30

Organen der Pflanze ermittelten Expressionsraten für besagte Markergene bestimmen. Funktionale Teile der Promotorsequenzen umfassen im Rahmen der vorliegenden Erfindung sowohl natürlich vorkommende Varianten der erfindungsgemäßen Sequenzen, als auch künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene Nucleotidsequenzen.

5

Unter einem funktionalen Teil werden insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten Promotorsequenz verstanden, welche die erfindungsgemäßen Merkmale und physiologischen Funktionen zeigen. Der Begriff „Mutationen“ umfasst hierbei Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen und/oder Insertionen eines oder mehrerer Nucleotide, insbesondere von geeigneten cis-Elementen. Somit werden beispielsweise auch solche Nucleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der durch Seq ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 definierten bzw. der durch DSM 13397 oder DSM 13398 hinterlegten Promotorsequenzen erhalten kann. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die Herstellung von Fragmenten oder die Einfügung oder Umstellung von bekannten Nukleotid-Motiven wie z.B. von Restriktionsschnittstellen oder cis-Elementen sein.

15

Funktionale Teile der erfindungsgemäßen Promotorsequenz umfassen dabei auch solche Promotorvarianten, deren Promotoraktivität, verglichen mit dem unmodifizierten Promotor (Wildtyp), abgeschwächt oder verstärkt ist.

20

Insbesondere werden unter funktionalen Teilen der erfindungsgemäßen Promotorsequenzen die durch Deletionsanalyse (vgl. Beispieltitel) identifizierten Bereiche verstanden, wie z.B. die Bereiche 1241-3103; 1515-3103; 1827-3103 und 2186-3103 der Seq ID No. 1 sowie die Bereiche 1331-2445 und 1834-2445 der Seq ID No. 2.

25

Prinzipiell wird die Aktivität eines eukaryontischen RNA-Polymerase II-Promotors durch das synergistische Zusammenwirken verschiedener *trans*-aktiver Faktoren

30



(DNA-bindende Moleküle wie Proteine oder Hormone) bedingt, welche an die verschiedenen im Promotor vorhandenen *cis*-regulatorischen DNA-Elemente, in der Regel etwa 10-20 Nukleotide lange DNA-Bereiche binden. Diese Faktoren wechselwirken direkt oder indirekt mit einzelnen oder mehreren Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie, was letztlich zur Ausbildung eines Präinitiationskomplexes in der Nähe der Transkriptionsstartstelle führt (Drapkin et al., Current Opinion in Cell Biology 5 (1993), 469-476). Man kann von einem modularen Aufbau eukaryontischer RNA-Polymerase II-Promotoren ausgehen, wobei die *cis*-Elemente (Module) als Teilkomponenten des Promotors dessen Aktivität im einzelnen determinieren (Tjian und Maniatis, Cell 77 (1994), 5-8).

Einzelne, potentiell Gewebespezifität vermittelnde Subdomänen des erfindungsgemäßen Promotors können beispielsweise durch Fusion mit einer Minimalpromotor-Reporter-gen-Kassette identifiziert werden. Unter einem Minimalpromotor versteht man eine DNA-Sequenz, die eine TATA-Box, die sich etwa 20 bis 30 Basenpaare stromaufwärts von der Transkriptionsstartstelle befindet, oder eine Initiatorsequenz (Smale und Baltimore, Cell 57 (1989), 103-113; Zawal und Reinberg, Proc. Natl. Acad. Sci. 44 (1993), 67-108; Conaway und Conaway, Annu. Rev. Biochem 62 (1993), 161-190) umfaßt. Beispiele für Minimalpromotoren sind der -63 bis +8  $\Delta$ 35S-Promotor (Frohberg, Dissertation an der FU Berlin FB Biologie (1994)), der -332 bis +14 Minimal-Patatin-ClassI-Promotor sowie der -176 bis +4-Minimal-PetE-Promotor (Pwee et al., Plant J. 3 (1993), 437-449.)

Desweiteren können solche Subdomänen bzw. *cis*-Elemente des erfindungsgemäßen Promotors auch über Deletionsanalysen bzw. Mutagenesen identifiziert werden (Kawagoe et al., Plant J. 5(6) (1994), 885-890). Der Test auf Funktionalität einer solchen Subdomäne oder *cis*-Elements des Promotors kann in *planta* durch den Nachweis der Reporter-genaktivität in transformierten Zellen erfolgen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung daher insbesondere auch Di- und Multimere von Subdomänen bzw. *cis*-Elementen der unter SEQ ID No.1 oder SEQ ID No. 2 definierten Nucleotidsequenzen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird die Erhöhung der Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp durch die Kombination des erfindungsgemäßen Promotors mit einem sogenannten Enhancer erreicht.

In der Literatur sind verschiedene Enhancer beschrieben worden, die in der Regel eine gewebespezifische Erhöhung der Expression bewirken, wobei die Gewebespezifität im allgemeinen durch den jeweils verwendeten Enhancer determiniert wird (Benfey et al., Science 250 (1990), 959-966; Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202; Chen et al., EMBO J. 7, (1988), 297-302; Simpson et al., Nature 323 (1986), 551-554).

Darüberhinaus gibt es auch Enhancer, wie z.B. den PetE Enhancer (Sandhu et al., Plant Mol. Biol. 37 (1998), 885-896), die nicht gewebespezifisch wirken und somit als quantitative Verstärkerelemente vor den erfindungsgemäßen Promotor gesetzt werden können, um die Expression in der Karyopse zu erhöhen, ohne die Qualität der Gewebespezifität des erfindungsgemäßen Promotors zu verändern.

Ferner können auch synthetische Enhancer verwendet werden, die beispielsweise von natürlich vorkommenden Enhancern abgeleitet sind und/oder durch Kombination verschiedener Enhancer erhalten werden.

Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotoren, die eine Nucleotidsequenz aufweisen, die mit der durch SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 definierten bzw. durch DSM 13398 oder DSM 13397 hinterlegten Nucleotidsequenz hybridieren, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen und die in Pflanzen eine karyopsenspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken.

Der Ausdruck "stringente Bedingungen" bedeutet dabei beispielsweise Hybridisierungsbedingungen, wie sie in Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschreiben sind. Insbesondere findet eine stringente

5 Hybridisierung unter den folgenden Bedingungen statt:

Hybridisierungspuffer: 2x SSC; 10x Denhardt's Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA; Verhältnis 1:1:1); 0.1% SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 250 µg/ml Heringssperma-DNA; 50 µg/ml tRNA; oder 0.25 M Natriumphosphatpuffer pH 7.2,

10 1mM EDTA, 7% SDS

Hybridisierungstemperatur T = 65 bis 68 °C;

Waschpuffer 0.2 x SSC; 0.1% SDS;

Waschtemperatur T = 65 bis 68° C.

15 Vorzugsweise weisen derartige Promotoren eine Sequenzidentität von mindestens 30%, bevorzugt von mindestens 40%, bevorzugt von mindestens 50%, besonders bevorzugt mindestens 60%, insbesondere bevorzugt von mindestens 70% und vorteilhafterweise von mindestens 80%, vorzugsweise mindestens 90% und insbesondere bevorzugt mindestens 95% zu der unter Seq ID No. 1 oder 2

20 gezeigten Promotorsequenz oder Teilen davon auf. Vorzugsweise wird die Sequenzidentität derartiger Promotorsequenzen durch Vergleich mit der unter SEQ

ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 dargestellten Nucleotidsequenz bestimmt. Wenn zwei zu vergleichende Sequenzen eine unterschiedliche Länge aufweisen, bezieht sich die Sequenzidentität vorzugsweise auf den prozentualen Anteil der Nucleotidreste

25 der kürzeren Sequenz, die identisch sind mit den Nucleotidresten der längeren Sequenz. Die Sequenzidentität kann üblicherweise durch Verwendung von

Computerprogrammen wie z. B. das Bestfit-Programm (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711) bestimmt werden. Bestfit

30 nutzt den lokalen Homologiealgorithmus von Smith und Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489, um das Segment mit höchster

Sequenzidentität zwischen zwei Sequenzen zu finden. Bei der Anwendung von

Bestfit oder einem anderen Sequenz-Alignment-Programm zur Bestimmung, ob eine bestimmte Sequenz beispielsweise zu 95% identisch ist mit einer Referenzsequenz der vorliegenden Erfindung, werden die Parameter vorzugsweise so eingestellt, daß der Prozentanteil der Identität über die gesamte Länge der Referenzsequenz

5

berechnet wird und daß Homologielücken ("gaps") von bis zu 5% der Gesamtzahl der Nucleotide in der Referenzsequenz erlaubt sind. Bei der Verwendung von Bestfit können die sogenannten optionalen Parameter bei ihren voreingestellten ("default") Werten belassen werden. Die Abweichungen, die bei dem Vergleich einer

10 gegebenen Sequenz mit den oben beschriebenen Sequenzen der Erfindung auftreten, können beispielsweise durch Addition, Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination verursacht sein. Promotorsequenzen, die wie oben beschrieben

mit der durch SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 definierten bzw. durch DSM 13398

oder DSM 13397 hinterlegten Nucleotidsequenz hybridisieren, stammen

15 vorzugsweise aus pflanzlichen Organismen, bevorzugt aus höheren Pflanzen, besonders bevorzugt aus monokotylen Pflanzen, insbesondere bevorzugt aus Gramineen und ganz besonders Pflanzen der Gattung *Triticum*.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch Promotoren, die einen funktionalen

20

Teil dieser Sequenzen aufweisen und die in Pflanzen eine karyopsenspezifische Expression einer von ihnen kontrollierten codierenden Nucleotidsequenz bewirken.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist der

erfindungsgemäße Promotor die gesamte oder einen funktionalen Teil der durch

25 SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 definierten bzw. durch DSM 13398 oder DSM

13397 hinterlegten Nucleotidsequenz auf, insbesondere Deletionsmutanten, die die Nukleotide 1241-3103; 1515-3103; 1827-3103 und 2186-3103 aus der Seq ID No. 1

sowie die Nukleotide 1331-2445 und 1834-2445 aus der Seq ID No. 2 umfassen.

30 Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Expressionskassetten enthaltend einen erfindungsgemäßen Promotor. Unter dem Begriff "Expressionskassette" wird dabei

die Kombination eines erfindungsgemäßen Promotors mit einer zu exprimierenden Nucleinsäuresequenz verstanden. Diese Nucleinsäuresequenz kann beispielsweise eine ein Polypeptid codierende Sequenz sein, z.B. ein Gen, das in sense- oder in antisense-Orientierung mit dem Promotor verknüpft sein kann. Die

5 Nucleinsäuresequenz kann auch eine nicht-translatierbare RNA, beispielsweise eine antisense-RNA oder ein Ribozym, codieren. Diese Nucleinsäuresequenzen können in Verbindung mit dem erfindungsgemäßen Promotor benutzt werden, um Pflanzen mit verändertem Phänotyp herzustellen.

10 Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten können weiterhin eine Transkriptionsterminationsequenz stromabwärts des 3'-Endes der mit dem Promotor verknüpften Nucleinsäuresequenz enthalten. Unter einer "Transkriptions-terminationsequenz" wird dabei eine DNA-Sequenz verstanden, die am 3'-Ende eines codierenden Genabschnitts lokalisiert ist und in der Lage ist, die Beendigung

15 der Transkription und gegebenenfalls die Synthese eines Poly-A-Schwanzes hervorzurufen. Ein Beispiel für eine solche Terminationsequenz ist die des Octopinsynthesegens. Weitere sind dem Fachmann gut bekannt.

20 Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, die mindestens einen erfindungsgemäßen Promotor enthalten.

25 In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform ist der erfindungsgemäße Promotor in einem derartigen Vektor verknüpft mit Restriktionsschnittstellen bzw. einem Polylinker, die eine Integration beliebiger Sequenzen stromabwärts des Promotors erlauben. Dabei wird unter einem "Polylinker" eine DNA-Sequenz verstanden, die Erkennungssequenzen von mindestens einem Restriktionsenzym, vorzugsweise von zwei oder mehr Restriktionsenzymen, enthält.

30 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält ein erfindungsgemäßer Vektor auch noch eine Sequenz für die Termination der Transkription,

beispielsweise die des Octopinsynthesegens, stromabwärts des Promotors bzw. des Polylinkers.

5 Ebenso betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, die erfindungsgemäße Expressionskassetten enthalten. Gegebenenfalls enthalten die erfindungsgemäßen Vektoren Selektionsmarker, die geeignet sind, Zellen, die die erfindungsgemäßen Vektoren enthalten, zu identifizieren und gegebenenfalls zu selektionieren.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Vektoren geeignet zur Transformation von pflanzlichen Zellen und besonders bevorzugt zur Integration von Fremd-DNA (z.B. Transgenen) in das pflanzliche Genom. Ein Beispiel für derartige Vektoren sind binäre Vektoren, die zum Teil auch bereits kommerziell erhältlich sind.

15 Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Wirtszellen, die mit einem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül (d.h. erfindungsgemäßen Promotor), einer erfindungsgemäßen Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor genetisch modifiziert sind, insbesondere pflanzliche Zellen oder mikrobielle Zellen, z. B. der Gattung *Agrobacterium*.

20 "Genetisch modifiziert" bedeutet dabei, daß die Wirtszelle einen erfindungsgemäßen Promotor, eine erfindungsgemäße Expressionskassette oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthält, vorzugsweise stabil ins Genom integriert, und der Promotor bzw. die Expressionskassette entweder in die Wirtszelle oder in einen Vorgänger dieser Zelle als Fremd-DNA eingebracht wurde. D.h. die

25 erfindungsgemäßen Zellen können entweder selbst das unmittelbare Produkt eines Transformationsereignisses sein oder davon abstammende Zellen, die einen erfindungsgemäßen Promotor oder eine erfindungsgemäße Expressionskassette enthalten. Als Wirtszellen kommen sowohl prokaryontische, insbesondere bakterielle, als auch eukaryontische Zellen in Frage. Eukaryontische Zellen können beispielsweise Pilzzellen sein, insbesondere der Gattung *Saccharomyces*.

30

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung von erfindungsgemäßen Vektoren, erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder erfindungsgemäßen Wirtszellen zur Transformation von Pflanzen, Pflanzenzellen, -geweben oder -teilen, insbesondere der Gattung *Agrobacterium*.

5

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Wirtszellen Pflanzenzellen, die im folgenden als transgene Pflanzenzellen bezeichnet werden.

10

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch Pflanzen, die erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthalten. Diese können jeder beliebigen Pflanzenart, -gattung, -familie, -ordnung bzw. -klasse angehören. Es können sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen sein. Vorzugsweise sind die erfindungsgemäßen Pflanzen Nutzpflanzen, d.h. Pflanzen, die für den Menschen von agrarwirtschaftlichem, forstwirtschaftlichem und/oder gartenbauwirtschaftlichem Interesse sind. Bevorzugt sind dabei landwirtschaftliche Nutzpflanzen, insbesondere Getreidearten wie z.B. Weizen, Hafer, Gerste, Roggen, Mais, Reis oder Futter- und Weidegräser (wie z.B. Alfalfa, weißer oder roter Klee).

20

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung auch Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß man Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile oder Protoplasten mit einem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül, einem erfindungsgemäßen Vektor, einer erfindungsgemäßen Expressionskassette oder mit einer erfindungsgemäßen Wirtszelle, vorzugsweise einem Mikroorganismus transformiert, die transformierten Zellen, Gewebe, Pflanzenteile oder Protoplasten in einem Wachstumsmedium kultiviert und im Fall der Herstellung transgener Pflanzen daraus Pflanzen regeneriert.

30

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung von erfindungsgemäßen Vektoren, erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder erfindungsgemäßen Wirtszellen zur Herstellung transgener Wirtszellen, insbesondere Pflanzenzellen und Pflanzen.

5

Die erfindungsgemäßen Pflanzen können nach dem Fachmann bekannten Verfahren hergestellt werden, z.B. durch Transformation pflanzlicher Zellen oder Gewebe und Regeneration ganzer Pflanzen aus den transformierten Zellen bzw. dem Gewebe.

10

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.

15

Verfahren zur Transformation von Pflanzenzellen und Pflanzen, vorzugsweise dikotylen Pflanzen, vorzugsweise unter Verwendung der Agrobakterium-vermittelten Transformation, sind intensiv untersucht und ausreichend in EP 0 120 516;

20

Hoekema (In: The Binary Plant Vector System, Offsetdruckerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Kapitel V); Fraley et al. (Crit. Rev. Plant Sci. 4 (1993), 1-46) und An et al. (EMBO J. 4 (1985), 277-287) beschrieben worden. Für die Transformation von Kartoffel siehe z.B. Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8 (1989), 29-33).

25

Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels Agrobakterium-basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282; Deng et al., Science in China 33 (1990), 28-34; Wilimink et al., Plant Cell Reports 11 (1992), 76-80; May et al., BioTechnology 13 (1995), 486-492; Conner und Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555;

30

Ritchie et al., Transgenic Res. 2 (1993), 252-265). Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104 (1994), 37-48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24 (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79 (1990), 625-631), insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (z.B. WO 95/06128, EP 0 513 849, EP 0 465 875, EP 0 292 435; Fromm et al., Biotechnology 8 (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2 (1990), 603-618; Kozl et al., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80 (1990), 721-726). Darüber hinaus stellen die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen oder die Einbringung von DNA mittels Glasfasern alternative, dem Fachmann bekannte Verfahren dar.

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits

beschreiben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al., Nature 296 (1982), 72-74) und für Weizen (Becker et al., Plant J. (1994) 5 (2): 229-307; Nehra et al., Plant J. 5 (1994), 285-297).

Für Reis wurden unterschiedliche Transformationsmethoden beschrieben, wie z.B. die Agrobacterium-vermittelte Transformation (Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282; Hiei et al., Plant Mol. Biol. 35 (1997), 205-218; Park et al., J. Plant Biol. 38 (1995), 365-371), die Protoplasten-Transformation (Datta, In "Gene transfer to plants", Potrykus, Spangenberg (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, 66-75; Datta et al., Plant Mol. Biol. 20 (1992), 619-629; Sadasivam et al., Plant Cell Rep. 13 (1994), 394-396), der biolistische Ansatz zur Pflanzentransformation (Li et al., Plant Cell Rep. 12 (1993), 250-255; Cao et al., Plant Cell Rep. 11 (1992), 586-591; Christou, Plant Mol. Biol. (1997), 197-203) sowie die Elektroporation (Xu et al., In "Gene transfer to plants", Potrykus, Spangenberg (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, 201-208).

30

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch Vermehrungsmaterial und Erntegut der erfindungsgemäßen Pflanzen, das erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthält. Der Begriff "Vermehrungsmaterial" umfaßt dabei jene Bestandteile der Pflanze, die geeignet sind zur Erzeugung von Nachkommen auf vegetativem oder generativem Weg. Für die vegetative Vermehrung eignen sich beispielsweise Stecklinge, Calluskulturen, Rhizome, Wurzelstöcke oder Knollen. Anderes Vermehrungsmaterial umfaßt beispielsweise Früchte, Samen, Sämlinge, Protoplasten, Zellkulturen etc. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial um Knollen oder Samen.

10

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Promotoren oder der mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens identifizierten Promotoren zur karyopsenspezifischen Expression von Transgenen in Pflanzen.

Der Begriff "Transgen" bedeutet dabei eine in eine Pflanze künstlich eingeführte DNA-Sequenz, die ein oder mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten.

Diese und andere Ausführungsformen sind dem Fachmann durch die Beschreibung und die Beispiele der vorliegenden Erfindung offenbart. Weiterführende Literatur kann zu einer der oben angeführten Methoden, Mittel und Verwendungen, die im Sinne der vorliegenden Erfindung angewendet werden können, dem Stand der Technik entnommen werden, z. B. aus öffentlichen Bibliotheken unter z. B. der Benutzung von elektronischen Hilfsmitteln. Zu diesem Zweck bieten sich unter anderem öffentliche Datenbanken an wie die "Medline", die über Internet zur Verfügung stehen, z. B. unter der Adresse

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Weitere Datenbanken und Adressen sind dem Fachmann geläufig und können aus dem Internet entnommen werden, z. B. unter der Adresse <http://www.lycos.com>. Eine Übersicht über Quellen und Informationen zu Patenten bzw. Patentanmeldungen in der Biotechnologie ist in Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364 gegeben.

30

Zur spezifischeren Beschreibung der Erfindung wird einer der erfindungsgemäßen Promotoren durch SEQ ID No. 1 repräsentiert, bestehend aus 3.809 Basen der genomischen Sequenz des isolierten gbss1-Subklons p11/1 wie durch DSM 13398 hinterlegt. Darin enthalten sind 3.103 Basen des 5'-flankierenden Bereichs und 646 Basen des codierenden Bereichs der GBSS I. Vergleiche der in SEQ ID No. 1 aufgeführten genomischen Sequenz mit dem isolierten cDNA-Klon der GBSS I (Block (1997) Dissertation, Universität Hamburg) zeigen im 5'-untranslatierten Bereich an Position 2.345 bis 2448 eine Homologie von 74,8% und an Position 3.240 bis 3.286 eine Homologie von 100%. Der 5'-untranslatierte Bereich des Gens wird durch ein 670 Basen langes Leader-Intron (Position 2.449-3.118) unterbrochen.

10

Der 5'-flankierend vom Startcodon gelegene DNA-Bereich (Promotor und 5'-untranslatierter Bereich mit Leader-Intron; SEQ ID. No. 1 Position 1-3.103) wurde hinsichtlich bekannter cis-regulatorischer DNA-Elemente von Pflanzen untersucht. Es wurden Endosperrm- bzw. samenspezifische DNA-Elemente an folgenden Positionen im GBSS I-Promotor (= SEQ ID No. 1) identifiziert:

15

-300bp-Elemente (TGTAAG) Position 906 (-) TGHAAARK

20

RY repeat (CATGCATG) Position 2147 (+) CATGCATG  
Position 929 (+) CATGCAT  
Position 989 (+) CATGCAT  
RY repeat (CATGCATG) Position 2147 (+) CATGCAT  
Position 270 (-) CATGCAT  
Position 2148 (-) CATGCAT

25

ACGT Motiv Position 1346 (+) GTACGTG  
Position 1401 (+) GTACGTG  
Position 1836 (+) GTACGTG

30

Amylase-Box

Position 2501 (-) TATCCAT

E-Boxen (CANNTG)

Position 451 (+) CANNTG  
Position 942 (+) CANNTG  
Position 967 (+) CANNTG  
Position 987 (+) CANNTG  
Position 997 (+) CANNTG  
Position 1038 (+) CANNTG  
Position 1140 (+) CANNTG  
Position 1363 (+) CACGTG (G-Box)  
Position 1571 (+) CANNTG  
Position 1990 (+) CANNTG  
Position 2017 (+) CANNTG  
Position 2038 (+) CANNTG  
Position 2567 (+) CANNTG  
Position 3045 (+) CANNTG  
Position 1050 (-) CACGTG (G-Box)  
Position 1695 (-) CACGTG (G-Box)  
Position 2962 (-) CACGTG (G-Box)

10

20

Napin Motiv (TACACAT)

Position 308 (+) TACACAT  
Position 940 (+) TACACAT  
Position 264 (-) TACACAT

25 SEF4 Motiv

Position 330 (+) RTTTTTR  
Position 2881 (+) RTTTTTR  
Position 241 (+) RTTTTTR  
Position 639 (+) RTTTTTR  
Position 2891 (+) RTTTTTR  
Position 721 (-) RTTTTTR  
Position 2670 (-) RTTTTTR

30

Position 3051 (-) RTTTTR

DNA-Elemente für eine pollenspezifische Genexpression wurden an folgenden

Positionen gefunden:

5 Pollen1

(LAT52; L. esculentum)

Position 609 (+) AGAAA

Position 702 (+) AGAAA

Position 1053 (+) AGAAA

Position 1057 (+) AGAAA

Position 1449 (+) AGAAA

Position 3060 (+) AGAAA

Position 27 (-) AGAAA

Position 104 (-) AGAAA

Position 141 (-) AGAAA

Position 254 (-) AGAAA

Position 409 (-) AGAAA

Position 520 (-) AGAAA

Position 559 (-) AGAAA

Position 563 (-) AGAAA

Position 656 (-) AGAAA

Position 771 (-) AGAAA

Position 822 (-) AGAAA

Position 2720 (-) AGAAA

Position 2825 (-) AGAAA

Position 2832 (-) AGAAA

Position 2836 (-) AGAAA

Q-Element (ZM13)

Position 2855 (+) AGGTCA

Position 2860 (+) AGGTCA

30 DNA-Elemente, die an einer durch Zucker regulierten Genexpression beteiligt sind  
wurden an folgenden Positionen gefunden:

TATCCAY-Motiv

Position 2501 (-) TATCCAY

CGACG-Element (AMY3, O. sativa)

Position 1761 (+) CGACG

Position 1289 (-) CGACG

Position 1488 (-) CGACG

Position 1748 (-) CGACG

Position 932 (-) CGACG

Wurzelspezifische DNA-Elemente wurden an folgenden Positionen gefunden:

10 Wurzel Motiv (Triticum aestivum POX1) Position 63 (+) ATATT

Position 278 (+) ATATT

Position 501 (+) ATATT

Position 753 (+) ATATT

Position 890 (+) ATATT

Position 277 (-) ATATT

Position 304 (-) ATATT

Position 870 (-) ATATT

DNA-Elemente, die an einer hormonell regulierten Genexpression durch ABA

20 beteiligt sind, wurden an folgenden Positionen gefunden:

ABRE Motiv (Oryza sativa em)

Position 1347 (+) TACGTGTC

Position 1067 (-) TACGTGTC

ABRE Motiv (Triticum aestivum L. Em)

Position 1931 (+) ACGTSSSC

25 DPBF Core (CDC3)

Position 941 (+) ACACNNG

Position 951 (+) ACACNNG

Position 966 (+) ACACNNG

Position 996 (+) ACACNNG

Position 1010 (+) ACACNNG

Position 1025 (+) ACACNNG

Position 1107 (+) ACACNNG

Position 1570 (+) ACACNNG  
 Position 1603 (+) ACACNNG  
 Position 2083 (+) ACACNNG  
 Position 296 (-) ACACNNG

5

DNA-Elemente, die an einer hormonell regulierten Genexpression durch Auxin bzw. Ethylen beteiligt sind, wurden an folgenden Positionen gefunden:

Auxin response factor (ARF A.thaliana) Position 2997 (-) TGTCTC

10

NIBBF1 Motiv (rolB) Position 614 (+) ACTTTA  
 Position 793 (+) ACTTTA

Ethylen RE (L.esculentum4)

Position 3035 (+) AWTTCAAA  
 Position 3041 (+) AWTTCAAA

15

DNA-Elemente, die für eine Licht- oder Temperatur-regulierte Genexpression stehen, wurden an folgenden Positionen im GBSS I-Promotor gefunden:

20 I-Box Position 713 (-) GATAA

Position 796 (-) GATAA

LowTemperature RE (H. vulgare) Position 1019 (+) ACCGACA

LowTemperature RE (A.thaliana) Position 1020 (+) CCGAC

Position 1324 (+) CCGAC

Position 1749 (-) CCGAC

Position 2536 (-) CCGAC

25

Neben anderen bekannten DNA-Motiven (GT1-Box, MART-Boxen, DOF-Boxen, Myb- und Myc-Boxen) enthält der unter SEQ ID No.1 aufgeführte Promotor weitere, bisher unbekannte Sequenzmotive. Ein DNA-Sequenzmotiv (CCACACACTACAA) an Position 2.292 zeigt Homologien zu DNA-Sequenzabschnitten des gbssI-

30

Promotors aus Gerste und einem DNA-Bereich im Puroindolin-Promotor aus Weizen (Digeon et al. (1999) Plant Mol. Biol. 39: 1101-1112; Acc. No. AJ000548), der in Reis die Expression des GUS-Reportergens in Endosperm, Aleuronzellen und im Perikarp reguliert. Repeats der Sequenz (CA)<sub>n</sub> befinden sich an den Positionen 948-

5

956, 1.007-1.015 und 1.024-1.030. Ein sich wiederholendes Sequenzmotiv (CTCACC) befindet sich an den Positionen 1.259 und 1.267. Zwei direkte

Sequenzwiederholungen (ACGTACGT) befinden sich an den Positionen 1.344 und 1.349. Weitere Sequenzwiederholungen (GAGAGC) befinden sich an Position

1.558, Position 1.614 (CGCGTG) und 1.644 (CCCACCGG). Ein Motiv der Sequenz (AAAC)<sub>n</sub> befindet sich an Position 1.888. Ein sich wiederholendes Motiv der Sequenz (GAA)<sub>n</sub> befindet sich an den Positionen 2.332 und 2.391 bis 2.435.

10

Sequenzbereiche, die Homologien zum GBSS I-Promotorbereich aus Gerste (GenBank Acc. No. X07931) aufweisen, befinden sich an den Positionen 1.383-1.406 (95% Sequenzidentität), 2.145-2.188 (93% Sequenzidentität) und 2.238-2.293

15 (90% Sequenzidentität).

Ein weiterer erfindungsgemäßer Promotor, der durch SEQ ID No.2 repräsentiert ist, beinhaltet DNA des genomischen ss2-Subklons p8/C wie durch DSM 13397

hinterlegt. Die Position 1-2.444 in SEQ ID No. 2 entspricht dem 5'-flankierenden

20 Bereich des Gens. Der Subklon p8/C enthält außerdem 373 Basen des kodierenden Bereichs der SS II (Position 2.445 bis 2.818). Ein Intron mit einer Länge von 91.

Basen liegt an Position 2.709 bis 2.800.

Der isolierte cDNA-Klon der SS II (WO 97/45545 A1) zeigt mit der in SEQ ID No.2 (= ss II-Promotor) aufgeführten genomischen Sequenz im 5'-untranslatierten Bereich (Position 2.273 bis 2.708) eine Homologie von 89%. Im ersten Exon (Position 2.445 bis 2.708) besteht zu dieser cDNA-Sequenz eine 92,6%ige Sequenzidentität.

25

Im dem 5'-flankierend vom Startcodon gelegenen Bereich der unter SEQ ID No.2 beschriebenen DNA-Sequenz liegen verschiedene cis-regulatorische Elemente,

30



Endosperm- bzw. samenspezifische DNA-Elemente wurden an folgenden Positionen im SS II-Promotor gefunden:

- 5    -300 Motiv (Zea, Z. mays)    Position 2228 (+) TGTAAAG  
      -300 Elemente (Gliadine, Glutenine)    Position 897 (+) TGHAAARK  
      Position 1057 (+) TGHAAARK  
      Position 1169 (+) TGHAAARK

Napin-Motiv    Position 1074 (-) TACACAT

- 10    (2S Albumin; Brassica napus)    Position 50 (+) CNAACAC  
      (CA)<sub>n</sub> Element (napA-Promotor)    Position 2181 (+) CNAACAC  
      Position 479 (-) CNAACAC

- 15    ACGT Motiv (Glu-B1, Oryza sativa)    Position 242 (+) GTACGTG  
      Amylase-Box    Position 1297 (+) TAACARA

- ( $\alpha$ -Amylase, Triticum aestivum)  
      CGACG-Element    Position 86 (+) CGACG  
      Position 2242 (-) CGACG  
      20    (Amylase, Oryza sativa)    Position 2245 (-) CGACG

E-Boxen (napA, B.napus)    Position 368 (+) CANNTG  
      Position 745 (+) CANNTG

- 25    Position 1053 (+) CANNTG  
      Position 1210 (+) CANNTG  
      Position 1513 (+) CANNTG  
      Position 1794 (+) CANNTG  
      Position 1872 (+) CANNTG  
      Position 1935 (+) CANNTG  
      Position 2056 (+) CACGTG (G-Box)

RY repeat (CATGCATG)

- Position 118 (+) CATGCATG  
   Position 297 (+) CATGCAY  
   Position 1908 (+) CATGCAT  
   Position 236 (-) CATGCAT  
   Position 366 (-) CATGCA  
   Position 118 (+) CATGCAT  
   Position 297 (+) CATGCAT

- 10    SEF1 Motiv (7S Globulin; G. max.)    Position 636 (+) ATATTTAAWW  
      Position 871 (+) ATATTTAAWW  
      Position 703 (-) ATATTTAAWW

- SEF4 Motiv (7S Globulin; G. max)  
   Position 552 (+) RTTTTTR  
   Position 839 (+) RTTTTTR  
   Position 1037 (-) RTTTTTR  
   Position 1547 (-) RTTTTTR  
   Position 814 (-) RTTTTTR  
   Position 876 (-) RTTTTTR  
   Position 961 (-) RTTTTTR  
   Position 1069 (-) RTTTTTR  
   Position 1334 (-) RTTTTTR  
   Position 1380 (-) RTTTTTR

- 25    DNA-Elemente für eine pollenspezifische Genexpression wurden an folgenden Positionen gefunden:

- Pollen1    Position 216 (+) AGAAA  
   (L. esculentum LAT52)    Position 663 (+) AGAAA  
      Position 683 (+) AGAAA  
      Position 753 (+) AGAAA  
      Position 772 (+) AGAAA

31

Position 793 (+) AGAAA  
 Position 982 (+) AGAAA  
 Position 1003 (+) AGAAA  
 Position 1015 (+) AGAAA  
 Position 1082 (+) AGAAA  
 Position 1203 (+) AGAAA  
 Position 1251 (+) AGAAA  
 Position 1271 (+) AGAAA  
 Position 1275 (+) AGAAA  
 Position 1314 (+) AGAAA  
 Position 1342 (+) AGAAA  
 Position 1350 (+) AGAAA  
 Position 1656 (+) AGAAA  
 Position 1677 (+) AGAAA  
 Position 1744 (+) AGAAA  
 Position 537 (-) AGAAA

5

10

15

Elemente, die an einer durch Zucker regulierten Genexpression beteiligt sind  
 wurden an folgenden Positionen gefunden:

20 ACGTA-Box ( $\alpha$ -Amylase; *O. sativa*) Position 2211(+) TACGTA  
 CGACG-Element (AMY3; *O. sativa*) Position 86 (+) CGACG  
 Position 2242 (-) CGACG  
 Position 2245 (-) CGACG  
 25 SURE-1 Position 1741 (+) AACAGAAAAA  
 (be2-Promotor, *Arabidopsis thaliana*)

Wurzelspezifische DNA-Elemente wurden im SS II-Promotor an folgenden

30 Positionen gefunden:

Wurzel Motiv Position 534 (+) ATATT

32

(POX1; *Triticum aestivum*)

Position 636 (+) ATATT  
 Position 871 (+) ATATT  
 Position 1026 (+) ATATT  
 Position 1031 (+) ATATT  
 Position 1036 (+) ATATT  
 Position 533 (-) ATATT  
 Position 613 (-) ATATT  
 Position 652 (-) ATATT  
 Position 688 (-) ATATT  
 Position 701 (-) ATATT  
 Position 707 (-) ATATT  
 Position 870 (-) ATATT  
 Position 1062 (-) ATATT  
 Position 1161 (-) ATATT

5

10

15

DNA-Elemente, die an einer hormonell regulierten Genexpression durch ABA oder  
 GA beteiligt sind, wurden an folgenden Positionen gefunden:

ABRE Motiv A (*Em; O. sativa*) Position 243 (+) TACGTGTC  
 20 Pyrimidin-Box (EBP1; *O. sativa*) Position 1222 (+) TTTTTCCTC  
 Position 1242 (+) TTTTTCCTC  
 DPBF Motiv (Dc3; *Daucus carota*) Position 2224 (+) ACACNNG  
 25 LTRE (*cor15a; A. thaliana*) Position 85(+) CCGAC  
 Position 42(-) CCGAC

Elemente, die an einer hormonell regulierten Genexpression durch Auxin bzw.

30 Ethylen beteiligt sind, wurden an folgenden Positionen gefunden:

ASF-1 Motiv (*CaMV 35S*) Position 1456 (+) TGACG

Position 1791 (-) TGACG  
Position 1808 (-) TGACG

Auxin response factor Position 2997 (-) TGTCTC

5 (ARF; *A. thaliana*)

NIBBF1 Motiv (rolB; *A. rhizogenes*) Position 1464 (+) ACTTTA

Ethylene RE (E4; *L. esculentum*) Position 1033 (+) AWTTCAAA

10 DNA-Elemente, die für eine Licht- oder Temperatur-regulierte Genexpression stehen, wurden an folgenden Positionen im SS II-Promotor gefunden:

I-Box Position 648 (+) GATAA

Position 672 (-) GATAA

Position 830 (-) GATAA

Position 1566 (-) GATAA

Position 1682 (-) GATAA

Position 1849 (-) GATAA

15

Low Temperature RE

Position 85 (+) CCGAC

20 (*cor15a*; *A. thaliana*)

Position 42 (-) CCGAC

Neben weiteren bekannten DNA-Motiven (GT1-Consensus, G-Box, MART-Boxen, ARS-Elementen, DOF-Boxen, GATA-Motiven, Myb- und Myc-Boxen) enthält der unter SEQ ID No.2 aufgeführte ssII-Promotor weitere, bisher unbekannte

25 Sequenzmotive. Dazu gehört ein Motiv der Sequenz ATAAAAATGT, das in einer etwa 300 Basen langen DNA-Region des SS II-Promotors insgesamt neun mal auftritt (Position 774, 795, 877, 920, 941, 962, 1038, 1070, 1085). Das

Sequenzmotiv hat Ähnlichkeit zu dem -300 Element (TGTAAG), auch Prolamin-Box genannt (Forde *et al.* (1985) Nucleic Acid Research 13: 7327-7339; Mena *et al.* (1998) Plant J. 16: 53-62), liegt aber in einem anderen Bereich des Promotors. Die Prolamin-Box wird etwa 300 Nukleotide vom Startpunkt der Translation in

Promotoren von Hordeinen (Gerste), Gliadinen und LMW-Glutinen (Weizen), sowie  $\alpha$ -Zeinen (Mais) gefunden. Auch in der isolierten genomischen Sequenz der ssII liegt ein Element der Sequenz TGTAAG, 217bp stromaufwärts vom Translationsstart.

5

Ein sich direkt wiederholendes, kurzes Sequenzmotiv (TCTA)<sub>4</sub> befindet sich an Position 1.982. Weitere direkte Sequenzwiederholungen befinden sich an den Positionen 69 (GCCT)<sub>2</sub> und 129 (GCT)<sub>3</sub>. Ein direktes Repeat der Sequenz AAAAATGTAATCAAGCATT befindet sich an den Positionen 962 und 1038. Im 5' untranslatierten Bereich, direkt vor dem Translationsstart (Position 2437 in SEQ ID No.2), befindet sich eine GC-reiche Sequenz (CGCGCGCC), die an gleicher Position auch im 5' untranslatierten Bereich des Mais zSSIIa cDNA-Klons vorliegt (Genbank Acc.No. AF019296; Ham *et al.* (1998) Plant Mol. Biol. 37: 639-649).

10 5' untranslatierten Bereich, direkt vor dem Translationsstart (Position 2437 in SEQ ID No.2), befindet sich eine GC-reiche Sequenz (CGCGCGCC), die an gleicher Position auch im 5' untranslatierten Bereich des Mais zSSIIa cDNA-Klons vorliegt (Genbank Acc.No. AF019296; Ham *et al.* (1998) Plant Mol. Biol. 37: 639-649).

15 Hinterlegung von Mikroorganismen:

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle SEQ ID No. 1 und 2 wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig, Deutschland gemäß Budapest Vertrag am 17. März 2000 (17.03.2000) mittels Plasmid DNA hinterlegt:

20 Plasmid p11/1 enthaltend SEQ ID No. 1 mit der Hinterlegungsnummer DSM 13398.  
Plasmid p8/C enthaltend SEQ ID No. 2 mit der Hinterlegungsnummer DSM 13397.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung ohne sie in irgendeiner Hinsicht zu beschränken.

25

Klonierungsverfahren

Zur Klonierung in *E.coli*-Bakterienstämme wurden die Vektoren pBluescript™ II SK(+/+) bzw. KS(+/+) Phagemid Vektoren (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) und Lambda Fix® II / XhoI Klonierungsvektor (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

30

### Bakterienstämme

Für die Blueskript-Vektoren wurden die *E. coli*-Stämme DH5 $\alpha$  (Life Technologies,

- 5 Karlsruhe, Deutschland) und Epicurian Coli SURE<sup>®</sup> (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Für die Bakteriophagen-Vektoren wurde der Epicurian Coli Stamm XL1-Blue MRA (Stratagene) verwendet.

Für molekularbiologische Arbeitstechniken wird häufig auf Sambrook et al. 1989

- 10 verwiesen: Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition; Cold Spring Harbour Laboratory Press).

### Ausführungsbeispiele

- 15 1. Herstellung der genomischen Weizenbank

Zur Herstellung der genomischen Weizenbanken wurde Gesamt-DNA aus etiolierten Keimlingen von *Triticum aestivum* L. cv. "Florida" isoliert. Zur Anzucht steriler

- 20 etiolierter Keimlinge wurden reife Karyopsen für 20 min mit 1% NaOCl, 0,1% (v/v)

Mucosal<sup>®</sup> (Merz & Co., Frankfurt, Deutschland) inkubiert und anschließend 3x mit

Aqua bidest gewaschen. Die Karyopsen wurden auf sterilem MS-Medium

(Murashige & Skoog (1962), Physiol. Plant. 15: 473-479), dem 0,3% (w/v)

GELRITE<sup>®</sup> (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) zur Verfestigung

zugesetzt wurde, ausgelegt. Das Wachstum erfolgte bei 26°C in Dunkelheit.

- 25 Vierzehn Tage nach dem Plattieren wurden die Keimlinge abgeschnitten und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Der partielle Verdau der genomischen DNA erfolgte mit den Restriktionsenzymen

BamH I bzw. Sau3A I (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland). Hierzu wurden 3

- 30 Aliquots die jeweils 100  $\mu$ g genomische DNA, 150  $\mu$ l des entsprechenden

Restriktionspuffers in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml mit 12,5 Units, 6,25 Units

bzw. 3,125 Units des Restriktionsenzymys BamH I bzw. 1,56 Units, 0,78 Units bzw.

0,39 Units Sau3A I für 1 h bei 37°C restringiert. Aliquots der partiell restringierten

DNA wurden anschließend gelelektrophoretisch auf den Grad der Restriktion

analysiert. Die Restriktionsenzyme wurden durch einmalige

- 5 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v) und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) Extraktion aus den Ansätzen entfernt. Abschließend wurde Saccharose bis zu einer Endkonzentration von 10% (w/v) zu jedem Ansatz zugegeben.

Die Größenfraktionierung der partiell restringierten DNA erfolgte in kontinuierlichen

- 10 10-40% Saccharose-Gradienten (w/v) (Sambrook et al. (1989)). Die einzelnen

Aliquots der partiell restringierten DNAs wurde vor dem Beladen jeweils eines 15 ml

Saccharosegradienten für 10 min auf 68°C erwärmt und dann auf 20°C abgekühlt.

Die Zentrifugation der Gradienten erfolgte für 24 h, bei 20°C und 22000 rpm

(Beckmann, Rotor SW 40). Nach der Zentrifugation wurden die einzelnen

- 15 Zentrifugenröhrchen im Boden angestochen und jeweils 500  $\mu$ l Aliquots gesammelt.

Von den einzelnen Fraktionen wurden 30  $\mu$ l in einem 0,5%igen Agarosegel

aufgetrennt und die Größenverteilung der DNA in den einzelnen Fraktionen

bestimmt. Fraktionen, die genomische DNA von ca. 4,0 kb und größer enthielten,

wurden vereinigt. Die Saccharose aus den Proben wurde durch Dialyse gegen

- 20 Tris/EDTA-Puffer (10 mM/1 mM) entfernt. Anschließend wurden die Proben mit 2-

Butanol eingeeengt und die DNA aus den Proben mit 2 Volumenteilen EtOH (99,8%)/

2 M Ammoniumacetat (Endkonzentration) bei Raumtemperatur (RT) ausgefällt.

Zum Auffüllen der 3'Enden der partiell restringierten DNA wurden 20  $\mu$ g der BamH I

- 25 bzw. Sau3A I restringierten DNA mit 1 mM dATP, 1 mM dGTP (Roche, Mannheim),

6  $\mu$ l 10x Pfu Reaktionspuffer und 10 Units native Pfu-DNA Polymerase (DNA-

Polymerase mit „proof-reading“ Aktivität; Stratagene GmbH, Heidelberg,

Deutschland) in einem Endvolumen von 60  $\mu$ l inkubiert. Die Reaktion wurde bei

72°C für 1 h 30 min durchgeführt. Abschließend erfolgte eine

- 30 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-, eine Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion der

DNA und nachfolgend eine Präzipitation der DNA mit 1/10 Vol. 3M NaAc und 2,5 Vol. EtOH (absolut).

- 1.1. Ligation in Lambda Fix<sup>®</sup> II/Xho I Partial Fill-In Vektoren (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Die BamH I bzw. Sau3A I restringierte genomische DNA wurde in den Lambda Fix<sup>®</sup> II/Xho I Klonierungsvektor nach Angaben des Herstellers (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) ligiert. Der Ligationsansatz enthielt: 1 µl des Lambda Fix<sup>®</sup> II Vektors, 0,4 µg BamH I bzw. Sau3A I restringierte genomische DNA, 0,5 µl 10x Ligationspuffer, 2 Weiss Units T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland); Weiss et al. (1968) J. Biol. Chem., 243: 4543-4555) in einem Endvolumen von 5 µl.

#### 1.2. In vitro Verpackung der Ligationsprodukte

- Zur Verpackung der Lambda Phagen wurde das *in vitro*-Verpackungskit "Gigapack<sup>®</sup> II Gold" der Firma Stratagene (Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet und den Angaben des Herstellers gefolgt.
- Von den Ligationsansätzen wurden jeweils 1 µl zu den Verpackungsansätzen dazugegeben und im Folgenden den Angaben des Herstellers gefolgt.

#### 1.3. Anzucht der Bakterien zur Phagenvermehrung

- Zur Phagenvermehrung wurde der *E. coli*-Bakterienstamm XL1-Blue MRA (P2) verwendet. Die Bakterien wurden in LB-Medium mit 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2% (w/v) Maltose bis zu einer OD 600 = 0,5 bei 37°C, 180 rpm angezogen. Anschließend wurden die Bakterien bei 2000 rpm, 10 min, 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert und die Bakterienlichte auf OD<sub>600</sub> = 0,5 eingestellt.

- Zur Phagenvermehrung wurden aus den Verpackungsansätzen 1 µl aus den Originalansätzen bzw. 1:10 Verdünnung der Originalansätze mit 200 µl

Bakteriensuspension (OD<sub>600</sub> = 0,5) gemischt und 15 min bei 37°C inkubiert.

- Anschließend wurden die einzelnen Ansätze mit 3 ml TOP-Agarose (48°C) gemischt und auf NZY-Festmedium nach Herstellerangaben (s.o. Lambda Fix<sup>®</sup> II/Xho I Partial Fill-In Vektoren, Stratagene) plattiert. Die Platten wurden für ca. 16 h bei 33°C inkubiert.

Die Phagentiter der Sau3A I bzw. der BamH I genomischen Banken wurden durch Auszählen der Phagenplaques bestimmt. Für die Sau3A I bzw. die BamH I Primärbanken wurden Phagentiter von  $2,2 \times 10^7$  pfu/ml bzw.  $1,4 \times 10^7$  pfu/ml ermittelt. Zur Bestimmung der durchschnittlichen Insertgrößen wurden von jeder Bank 10 einzelne Phagenklone amplifiziert, die Phagen-DNA isoliert (Sambrook et al. 1989) und die Insertgrößen nach Restriktionsverdau und gelelektrophoretischer Auftrennung ermittelt. Die durchschnittliche Insertgröße beträgt ca. 15,0 Kb für die BamH I bzw. 15,6 Kb für die Sau3A I Bank.

#### 1.4. Amplifizierung der genomischen Banken

- Zur Herstellung repräsentativer, amplifizierter genomischer Banken wurden von jeder Bank ca. 4,5 Millionen pfu plattiert. Die Amplifizierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Stratagene). Die Phagentiter der amplifizierten Banken betrug  $6,3 \times 10^9$  pfu/ml (BamH I-Bank) bzw.  $2,0 \times 10^9$  pfu/ml (Sau3A I-Bank).

#### 2. Durchmusterung der genomischen Banken

- Die Identifizierung und Isolierung von Phagenklonen, deren genomische Inserts Sequenzen der gbssl- bzw. ssl-Gene tragen, erfolgte über Plaque-Hybridisierung.
- Zum Durchmusterung der genomischen Banken wurden ca. 500.000 Phagen von jeder Bank ausplattiert. Das Ausplattieren der Phagen und Abziehen der Platten erfolgte nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989; Stratagene Lambda Fix<sup>®</sup> II Manual). Als genspezifische Sonden wurden DNA-Fragmente von cDNA-Klonen der GBSS I (Block, M. (1997) "Isolierung, Charakterisierung und Expressionsanalysen

von Stärkesynthase-Genen aus Weizen (*Triticum aestivum* L.)". Dissertation, Universität Hamburg) und einer SSII (WO 97/45545 A1) eingesetzt.

Die verwendete SSII-Sonde wurde mit sequenzspezifischen Primern über eine PCR-Reaktion aus einem isolierten ssII cDNA-Klon amplifiziert. Die Markierung des 772bp großen Amplifikationsprodukts (Position 1264-1972 der ssII cDNA) erfolgte während der PCR-Reaktion durch den Einbau von DIG-dUTPs (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

- |    |  |
|----|--|
| 10 | 10µl PCR-Puffer (10x conc.; Life Technologies)               |
|    | 3µl MgCl <sub>2</sub> (50mM; Life Technologies)              |
|    | 3,5µl DIG dUTPs (1nmol/µl; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) |
|    | 10µl dNTP-Mix (je 2,5mM)                                     |
|    | 5µl Primer LW2 (10pmol/µl)                                   |
| 15 | 5µl Primer LW9 (10pmol/µl)                                   |
|    | 50ng Template (cDNA-Klon der ssII)                           |
|    | 0,5µl Taq-Polymerase (5U/µl; Life Technologies)              |
|    | ad 100µl ddH <sub>2</sub> O                                  |

Die Bedingungen für die PCR waren folgendermaßen:

- |    |   |
|----|---|
| 20 | I. 94°C, 2min, 30sec                          |
|    | II. 94°C, 45sec                               |
|    | III. 60°C, 45sec                              |
|    | IV. 72°C, 2min, 30sec (IV.→ II. 29 Schleifen) |
| 25 | V. 72°C, 3min                                 |

Die Sequenzen der ssII-spezifischen Primer für die Amplifikation der PCR-Sonde:

LW2: 5'-CTGCTGGACAGGATATGGAA-3' (SEQ ID No. 3)

LW9: 5'-TCGGCTGCAGGGCCTCTT-3' (SEQ ID No. 4)

Die Markierung eines 283bp großen DNA-Fragments des gbssl cDNA-Klons erfolgte über eine spezifische PCR-Reaktion, unter Einbau von DIG-markierten dUTP's

(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Die PCR-Reaktion wurde mit Primern durchgeführt, die innerhalb des ersten Exons des gbssl cDNA-Klons (Position 146-429) liegen.

- |   |  |
|---|--|
| 5 | W1: 5'-ATGGCGGCTCTGTGTCACGTC-3' (SEQ ID No. 5) |
|   | W2: 5'-AGGCCGCCAGTCTTGCTCCA-3' (SEQ ID No. 6)  |

Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

- |    |  |
|----|--|
| 10 | 10µl PCR-Puffer (10xconc.; Life Technologies)    |
|    | 3µl MgCl <sub>2</sub> (50mM; Life Technologies)  |
|    | 3µl DIG dUTPs (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) |
|    | 3µl dNTP-Mix (je 5mM)                            |
|    | 6µl Primer W1 (10pmol)                           |
|    | 6µl Primer W2 (10pmol)                           |
| 15 | 10ng Template (cDNA-Klon der gbssl)              |
|    | 1µl Taq-Polymerase (5U/µl; Life Technologies)    |
|    | ad 100µl ddH <sub>2</sub> O                      |

Die Bedingungen für die PCR waren folgendermaßen:

- |    |   |
|----|---|
| 20 | VI. 94°C, 5min                          |
|    | VII. 94°C, 30sec                        |
|    | VIII. 62°C, 30sec                       |
|    | IX. 72°C, 60sec (IV.→ II. 29 Schleifen) |
| 25 | X. 72°C, 5min                           |

Die Prähybridisierung der Filter erfolgte in 5x SSC, 3% Blockingreagenz (Boehringer Mannheim), 0,2% Na-dodecylsulfat (SDS), 0,1% N-Laurylsarcosin und 30µg/ml Heringssperma-DNA bei 65°C im Wasserbad. Die Hybridisierung mit den DIG-markierten DNA-Sonden (6ng/ml Hybridisierungslösung) erfolgte über Nacht bei 65°C im beschriebenen Standard-Hybridisierungspuffer. Alle weiteren Schritte der

Chemilumineszenz-Reaktion mit CSPD® erfolgten nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

Positive Plaques wurden ausgestochen und über zwei weiteren Runden der Amplifikation und Plaque-Filterhybridisierung vereinzelt. Die DNA der isolierten positiven Phagen wurden gereinigt Qiagen® Lambda Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und nach einer Agarose-Gelelektrophorese in Southern-Hybridisierungen mit den bereits beschriebenen Sonden analysiert.

10

3. Subklonierung der  $\lambda$ -Phagenklone in bakterielle Vektoren (pBluescript™ II) Die genomischen Inserts der positiven Phagenklone wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Die resultierenden Subfragmente wurden in bakterielle Vektoren (pBluescript™ II SK(+/-) bzw. KS(+/-) Phagemid Vektoren; Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland) kloniert.

15

Über Southern-Hybridisierungen erfolgte die Isolierung von gbssl- bzw. ssl-spezifischen Klonen mit 5'-stromaufwärts gelegenen regulativen Elementen. Dazu wurde für die SSII eine weitere Digoxigenin-markierte Sonde hergestellt, die im äußersten 5'-Bereich der cDNA-Sequenz liegt. Die Sonde erstreckt sich vom 5'-untranslatierten Bereich des cDNA-Klons der ssl bis in das erste Exon (Position 1-218 der ssl-cDNA aus WO 97/45545 A1). Das Fragment wurde aus der cDNA der ssl (in pBluescript™ SK II) über einen Restriktionsverdau mit SmaI herausgeschnitten und nach der Auftrennung über eine Agarosegelelektrophorese isoliert. Die Markierung des SmaI-Fragmentes erfolgte über Random Priming mit dem DIG DNA Labeling Kit nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

25

#### 4. Sequenzanalysen

Für die Sequenzierung der genomischen Klone der GBSSI und SSII und ihrer 5'-stromaufwärts gelegenen regulativen Elemente wurde die Firma SeqLab GmbH (Göttingen) beauftragt.

5

5. Klonierungen von Promotor-Testvektoren Die Funktionsfähigkeit der in SEQ ID No.1 und SEQ ID No.2 aufgeführten 5'flankierenden DNA-Bereiche wurde in transienten und stabilen Expressionsanalysen überprüft. Als Reportergen wurde das Gen der  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) verwendet (Jefferson (1987) Plant Molecular Biology Reporter Vol.5 (4): 387-405). Es wurden Promotor-testvektoren kloniert, in denen die codierende Region des gus-Gens (uidA) unter Kontrolle des in SEQ ID No.1 (Position 1-3.163) oder SEQ ID No.2 (Position 1-2.445) aufgeführten 5'flankierenden DNA-Bereichs steht. Die Klonierung erfolgte als transkriptionale Fusion. Zunächst wurde das uidA-Gen über einen partiellen Verdau zusammen mit dem nos-Terminator aus dem Vektor pCal-GUS (uidA-Gen unter Kontrolle des

10

CaMV 35S-Promotors; Chris Warren, Stanford Universität, unveröffentlicht) herausgeschnitten und hinter die Multiple Cloning Site von pBluescript (Stratagene) kloniert. Der so erzeugte promotorlose Vektor (uidA-nos) wurde für die weiteren Klonierungen verwendet.

15

20

Auch die 5'-untranslatierte Leadersequenz einer mRNA kann einen Einfluß auf die gewebespezifische Expression eines Gens haben (Rouster *et al.* (1998) Plant J. 15 (3): 435-440). Die klonierten Promotor-testvektoren beinhalten daher diesen Bereich des GBSSI- oder des SSII-Gens. In der gewählten Klonierungsstrategie liegt das Start-Codon der  $\beta$ -Glucuronidase an der Position des Start-Codons der GBSSI oder der SSII.

25

#### 5.1. Klonierung der GBSSI-Promotor-testvektoren

Das Ausgangskonstrukt des GBSSI-Promotor-testvektors trägt 4,0kb des

30

5'flankierenden DNA-Bereichs der GBSSI. Die Klonierung in den promotorlosen uidA-nos-Vektor erfolgte über einen Restriktionsverdau der Plasmide p1/1 (gbss I)

und uidA-nos mit den Enzymen NcoI und SacI. Der 4.000 Basen lange 5' flankierende Bereich wurde anschließend durch unterschiedliche Deletionen verkürzt, was zur Entfernung von DNA-Bereichen führte, in denen die beschriebenen DNA-Elemente liegen. Der GBSS I-Promotortestvektor wurde im 5' flankierenden Bereich durch Restriktionen mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen deletiert. Es wurden folgende Deletionskonstrukte des GBSS I-Promotors kloniert:

- 5 5' flankierenden Bereich durch Restriktionen mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen deletiert. Es wurden folgende Deletionskonstrukte des GBSS I-Promotors kloniert:
- 1,9 GBSS I / GUS (XbaI-Restriktion an Position 1240; enthaltend die Nukleotide 1241-3103 von SEQ ID No.1);
- 10 -1,6 GBSS I / GUS (SmaI-Restriktion an Position 1514; enthaltend die Nukleotide 1515-3103 von SEQ ID No.1);
- 1,3 GBSS I / GUS (KpnI-Restriktion an Position 1826; enthaltend die Nukleotide 1827-3103 von SEQ ID No.1);
- 1,0 GBSS I / GUS (BamHI-Restriktion an Position 2185; enthaltend die Nukleotide 2186-3103 von SEQ ID No.1) und
- 15 -0,4 GBSS I / GUS (Bgl II-Restriktion an Position 2740; enthaltend die Nukleotide 2705-3103 von SEQ ID No.1).

## 5.2. Klonierung der SS II-Promotortestvektoren

- 20 Das Ausgangskonstrukt der ssII-Promotortestvektoren trägt 2.445bp der 5'-flankierenden genomischen Sequenz der SS II. Die Klonierung des SS II-Promotortestvektors wurde mit der Methode des "Splicing by Overlap Extension" (Horton (1997) Methods in Molecular Biology Vol.67: PCR Cloning Protocols (14): 141149, White Humana Press Inc.) durchgeführt. Zuerst wurde ein Fragment des genomischen SS II-Subklons p8/C über einen Restriktionsverdau mit SacI und SmaI in das promotorlose Plasmid uidA-nos kloniert.
- 25

Die Erzeugung von Intermediär-Produkten für die Methode des "Splicing by Overlap Extension" erfolgte unter Einsatz folgender Primerpaare:

- a) Amplifizierungsreaktion mit genomischem SS II-Subklon als Matrize:

30

- SOE-A 5'-TCACGTGGATTCTGCAACCTC-3' (SEQ ID No. 7)
- SOE-B 5'-CAGGACGGACCATGGCGGCGCGGGAT-3' (SEQ ID No. 8)

## b) Amplifizierungsreaktion mit Plasmid pCalGUS als Matrize:

- 5 SOE-C 5'-CGCCGCCCATGTCCGTCCTGTAGAAACCC-3' (SEQ ID No. 9)
- SOE-D 5'-GTGATGTCAGCGTTGAACTGC-3' (SEQ ID No. 10)

Die Reaktionsansätze wurden nach Horton (Methods in Molecular Biology (1997) Vol.67: PCR Cloning Protocols (14): 141149, White Humana Press Inc.) angesetzt,

die Bedingungen für die PCR waren folgendermaßen:

- I. 94°C, 90sec
- II. 94°C, 1min
- III. 64°C, 1min
- IV. 72°C, 1min (IV. → II. 20 Schleifen)
- 15 V. 72°C, 3min

Die Amplifizierung des PCR-Produkts für die Klonierung erfolgte mit den Primersequenzen SOE-A und SOE-D. Als Matrize dienten die erzeugten Intermediärprodukte. Der Reaktionsansatz wurde nach Horton (Methods in Molecular Biology (1997) Vol.67: PCR Cloning Protocols (14): 141149, White Humana Press Inc.) angesetzt, die PCR-Reaktionsbedingungen waren wie folgt:

- I. 96°C, 2min
- II. 94°C, 1min
- III. 68°C, 2min
- 25 IV. 72°C, 2min (IV. → II. 25 Schleifen)
- V. 72°C, 10min

Die Klonierung des resultierenden PCR-Produktes zwischen den SS II-Promotor und das uidA-Gen erfolgte nach einem Restriktionsverdau mit den Enzymen Not I (Schnittstelle im SS II-Promotor) und Bal I (Schnittstelle im uidA-Gen). Der 2.445

Basen lange Bereich des SS II-Promotors wurde anschließend durch Deletionen im



5' flankierenden Bereich verkürzt, dadurch wurden Bereiche mit beschriebenen DNA-Elementen im Promotor entfernt. Die Deletionen des SS II-Promotorrestvektors wurde durch Restriktionen mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen durchgeführt.

Folgende Deletionskonstrukte des SS II -Promotors wurden kloniert:

5 -2,05 SS II / GUS (KpnI-Restriktion an Position 398; enthaltend die Nukleotide 399-2444 von SEQ ID No.2);

-1,11 SS II / GUS (SpeI-Restriktion an Position 1330; enthaltend die Nukleotide

1331-2444 von SEQ ID No.2);

-0,61 SSII / GUS (HindIII-Restriktion an Position 1833; enthaltend die Nukleotide

10 1834-2444 von SEQ ID No.2);

-0,53 SSII / GUS (SphI-Restriktion an Position 1912; enthaltend die Nukleotide

1913-2444 von SEQ ID No.2) und

-0,28 SSII / GUS (NotI-Restriktion an Position 2164; enthaltend die Nukleotide 2165-2444 von SEQ ID No.2).

15

6. Transiente Expressionsanalysen der Promotor-Testvektoren

Die Funktionsfähigkeit der isolierten Promotorkonstrukte wurde in transienten

Expressionsanalysen überprüft. Die Tests wurden mit den aus Beispiel 5 erhaltenen

GBSS I- und SS II- Promotorrestvektoren und ihren Deletionskonstrukten

20 durchgeführt.

Die transienten Expressionsanalysen erfolgten nach biolistischer Transformation von verschiedenen Geweben (Karyopsen, Embryonen, Blätter, Wurzeln) von Weizen.

Die Transformation von Embryonen, Blätter und Wurzeln wurde nach Becker *et al.*

25 (Plant J. (1994) 5 (2): 228-307) durchgeführt, während die biolistische

Transformation des Endosperms von Karyopsen modifiziert nach Mena *et al.* (Plant J. (1988) 16(1), 53-62) erfolgte. Der Nachweis der Reportergenaktivität erfolgt durch

histochemischen Nachweis der GUS-Aktivität (Jefferson (1987) Plant Molecular

Biology Reporter Vol.5 (4): 387-405). Die Experimente an 10-30 Tage alten (dap),

30 längs- und querschnittenen Weizenkaryopsen zeigten, daß beide Promotoren zu einer Expression des Reportergens im Endosperm führen. In den transienten Tests

war die Aktivität des uidA-Reportergens unter Kontrolle des gbss1-Promotors stärker als unter Kontrolle des ss2-Promotors.

Folgende Deletionskonstrukte des GBSS I-Promotors erwiesen sich in transienten

5 Expressionsanalysen als funktionsfähig:

-4,0 GBSS I / GUS, enthaltend die Nukleotide 1-3103 von SEQ ID No.1)

-1,9 GBSS I / GUS (XbaI-Restriktion an Position 1240)

-1,6 GBSS I / GUS (SmaI-Restriktion an Position 1514)

-1,3 GBSS I / GUS (KpnI-Restriktion an Position 1826)

10 -1,0 GBSS I / GUS (BamHI-Restriktion an Position 2185)

Nach einer Deletion an Position 2.704 (-0,4 GBSS I / GUS) konnte keine GUS-Aktivität des Reportergens mehr festgestellt werden.

Folgende Deletionskonstrukte des SS II-Promotors erwiesen sich in transienten

15 Expressionsanalysen als funktionsfähig:

-2,45 SS II / GUS, enthaltend die Nukleotide 1-2444 von SEQ ID No.2

-1,11 SS II / GUS (SpeI-Restriktion an Position 1330)

-0,61 SSII / GUS (HindIII-Restriktion an Position 1833)

Das Konstrukt -0,28 SSII / GUS (NotI-Restriktion an Position 2164) zeigte dagegen

20 keine GUS-Reportergenaktivität mehr.

7. Stabile Transformation von Weizen mit den Promotor-Testvektoren

Die in Beispiel 5 beschriebenen Promotorrestvektoren und Deletionskonstrukte wurden zur Erzeugung stabil transformierter Weizenpflanzen verwendet:

25 -4,0 GBSS I / GUS

-1,9 GBSS I / GUS (XbaI-Restriktion an Position 1240; SEQ ID No.1)

-1,0 GBSS I / GUS (BamHI-Restriktion an Position 2185; SEQ ID No.1)

-2,45 SS II / GUS

-1,11 SS II / GUS (SpeI-Restriktion an Position 1330; SEQ ID No.2)

30 -0,61 SSII / GUS (HindIII-Restriktion an Position 1833; SEQ ID No.2)

Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgte nach der Methode von Becker *et al.* (Plant J. (1994) 5 (2): 229-307). Als Selektionsmarker wurden die glufosinate- bzw. Neomycin-Resistenz tragenden Plasmiden p35S-PAT (Aventis CropScience GmbH, Frankfurt) bzw. pAct1Dneo (Müller (1992) Dissertation, Universität Hamburg) eingesetzt.

#### 8. Analyse der GUS-Reportergenexpression in stabil transformierten

##### Weizenpflanzen

Die funktionale Analyse der gbssI- und ssl-Promotoren erfolgte nach der

Regeneration der transgenen Pflanzen und dem Nachweis einer stabilen und vollständigen Integration der Testkonstrukte in das Weizen genom über Southern-Analysen.

Die Reportergenaktivität in den regenerierten transgenen Pflanzen wurde über einen

#### 15 histochemischen GUS-Nachweis untersucht. Verschiedene Gewebe der

Transgenen (Blätter, Wurzeln, Stengel, Endosperm, Embryo, Pollen) wurden analysiert. Die Karyopsen der mit den gbss I-Testvektoren stabil transformierten Pflanzen weisen eine starke GUS-Färbung im zentralen Stärkeendosperm auf. Die GUS-Aktivität konnte bereits in sehr jungen Karyopsen im sich entwickelnden

Endosperm nachgewiesen werden. Sehr früh nach Befruchtung ist außerdem eine Aktivität des GUS-Reportergens im Perikarp nachweisbar, die in älteren Karyopsen nicht mehr auftritt. Keine GUS-Aktivität konnte dagegen im Embryo, dem Aleuron und der Embryo-umgebenden Region nachgewiesen werden. Auch im assimilierenden Gewebe der Blätter, sowie in den Stengeln und Wurzeln konnte keine Reportergen-Aktivität nachgewiesen werden. In transgenen Pollen wurde eine GUS-Aktivität detektiert. Quantitative Analysen der Expression des Reportergens erfolgten über fluorimetrische GUS-Nachweise sowie in Northern-Blot Analysen.

#### Patentansprüche:

1. Nukleinsäuremolekül mit der Funktion eines karyopsenspezifischen Promotors, das  
ein oder mehrere Sequenzelemente umfaßt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Nukleotiden 1736-1764 der Seq ID No. 1; 1885-1906 der Seq ID No. 1; 1937-2011 der Seq ID No. 1; 2115-2140 der Seq ID No. 1; 2306-2319 der Seq ID No. 1; 2940-2963 der Seq ID No. 1 und 3012-3029 der Seq ID No. 1;  
10
- b) die durch Seq ID No. 1 (DSM 13398) oder Seq ID No. 2 (DSM 13397) definierte Nukleinsäuresequenz umfaßt;  
15
- c) einen funktionalen Teil der in b) genannten Nukleinsäuresequenz umfaßt;  
d) eine Sequenz umfaßt, die mit mindestens einer der in b) genannten Nukleinsäuresequenzen hybridisiert;  
und/oder  
e) eine Sequenz umfaßt, die mit einer der in b) genannten Nukleinsäuresequenz zu mindestens 60 %, vorzugsweise zu mindestens 75 % und insbesondere zu mindestens 90 % identisch ist.  
20
2. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, der ein pflanzlicher Promotor ist.
3. Expressionskassette enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 2.  
25
4. Vektor enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 2 oder eine Expressionskassette nach Anspruch 3.
5. Vektor nach Anspruch 4, der zur Transformation von pflanzlichen Zellen geeignet ist.  
30

6. Wirtszelle, die genetisch modifiziert ist mit einem Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 2, mit einer Expressionskassette nach Anspruch 3 oder einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 - 5.

5 7. Wirtszelle nach Anspruch 6, die eine pro- oder eukaryontische Zelle ist.

8. Wirtszelle nach Anspruch 6, die eine Pflanzenzelle ist.

9. Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 8.

10

10. Vermehrungsmaterial oder Erntegut von Pflanzen nach Anspruch 9, enthaltend Pflanzenzellen nach Anspruch 8.

11. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen nach Anspruch 8, worin man Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile oder Protoplasten mit einem Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 2, einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 - 5, mit einer Expressionskassette nach Anspruch 3 oder mit einer Wirtszelle nach Anspruch 6 transformiert, und die transformierten Pflanzenzellen, -gewebe, -teile oder Protoplasten in einem Wachstumsmedium kultiviert.

20

12. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen nach Anspruch 9, worin man Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile oder Protoplasten mit einem Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 2, einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 - 5, mit einer Expressionskassette nach Anspruch 3 oder mit einer Wirtszelle nach Anspruch 6 transformiert, die transformierten Pflanzenzellen, -gewebe, -teile oder Protoplasten in einem Wachstumsmedium kultiviert und daraus ganze Pflanzen regeneriert.

25

14. Verwendung eines Promotors nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 2 zur karyopsenspezifischen Expression von Genen in genetisch modifizierten Pflanzen.

## Zusammenfassung

## Promotoren zur Genexpression in Karyopsen von Pflanzen

5

Die vorliegende Erfindung stellt Promotoren bereit, die eine karyopsenspezifische Expression von ihnen kontrollierter codierender Nucleotidsequenzen bewirken und Expressionskassetten, rekombinante Vektoren und Wirtszellen, die solche Promotoren umfassen. Ferner werden transformierte transgene Pflanzenzellen und Pflanzen beschrieben, sowie Verfahren zu deren Herstellung.

10

## SEQUENCE LISTING

<110> Aventis CropScience GmbH

<120> Promotoren zur Genexpression in Karyopsen von Pflanzen

<130> AGR 2000/M 215

<140> -

<141> 2000-07-06

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3809

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<400> 1

gtttggttc gcgtgttttc attctcttc ttcttaaggg gtaataccaa tgacagtaat 60

tcattattg taacagtgcg attctgtgc caattatgta caattcttt tgaattgtt 120

tgttcatgt ttatttcat ttctttact tttaggggta aaaccaatgc cccaattca 180

tttaacctaa gaggaatc agttttatc tagtttcagt ttattatg ttattatgt 240

gttttagtt ggtttctca ttatgtata tgcataata ttagggtgt gttggtgt 300

gttaataac acataagtat tatacccca ttittgcagt cataaatta tgaatttca 360

gtacaaatg tgcgcaaat ctcttcatt ttattttt ttatttatt ttctcttaa 420

ggtaataac atgatacta attatgcct catitggaaa ttctgtttg aaattatgc 480

tagtaacac ttattctgt atatttga aaagcgaat ttctgtgaa gtttgcac 540

tcgtattt ttctattt ttctttctt ggaaggttaa cactaatgc actaatcat 600

tcgtgttag aaactttag tatttgatt gtgttttag ttatttca ttigtctt 660

ttttaaggg aaatacaat gccactaat cattccatct tagaatact ttattotta 720

caaaactca actttatat gcttattct gcatattata aaagcacag ttctatcta 780

aatgctgtc aaactttatc attattgtc taatttaatt ttcttaga tgatgatac 840

aatgccacta attcttcg tggacgca atctgcgga tgmwacgta tattaaggt 900

gtgcattt tcatctca cgcattgga tgcatacct acatctgc acacacgat 960

acaaacaca tgagactca cgcagacaca tgcatacacc ttgtgcaca cacagcac 1020

cgacacac gcacagcac atcgtgcac ttagaagaa aaatagaca cgtatacat 1080

ggactggcta gctatacac cgtgtaacac tagtacttg gattgtag acctatttc 1140

aggtgcaca gactagtatt ttcaaggcac tgggatatag ccacgccta ttgttgtg 1200

tcgtaggag aaaaaggtca tataatggc actggcttc tagagactt ccaagaggt 1260

cacaccta cgtgagtga cagccacgc tgggttaac caccgattt asgttcccc 1320

gatacaca agcagggga cgcactag tgcctagt ttgttcata ccagagcgt acgtcaatca 1380

acgcgcggt ttggagcac gtactgtca gctgtcata ccagagcgt acgtcaatca 1440

agcaaaag aaaaagaag ggcgaagt gatacgcgc cgcgtatc cgtgctgag 1500

aggaagcaat cccgggcat cgcagccat tgcacgcc cagcaaaag ggaaggag 1560

agcagagca cacatggccc ccagactga agcagggga gcacagaga agcgcgtgc 1620

gcattgacat cacagcaga acaccacgc gcagccacc ggcgggccc ggcagaga 1680

agaagatgc tgcagcgc gcgcgcaac ggaaggggc cgcggcgcc gagcgacgc 1740

aaaggcggt cggcagcca cgcagcgc ggaagcgc cgcggcaac gagaatgtc 1800

caggttgcca cgcgtccgc ggtaccacta gtctgtac tgtgccac cactccgc 1860

cgtcggcac gcagcagc aggcagtaa caaacaaca acaaaaag tgggtcattc 1920

actycacta acgtcgcct tcaggagat gctcgtgc ctaagcac ctactctt 1980

tgctatgac atgtgaccc aacagatgg ctggccaca tgcagtgt ccaargag 2040

gtccttwa aggcacgaa ccttgcttc cgccttca ttacagggg caattgatg 2100

cgbtgctg cctccctc tagcgctgc gctccgccc cgcgtgcat catcgagag 2160

gagcggag gagcggtat tggggatcca gccacggag gactgagca ggcggcgag 2220

asaaataac cactaccc gagccagca cgttctgt ccttgatgc cgtcattc 2280

gcgcgcgc ccacacact acaaccagg agcttcgat ctgccagta aggaagaaga 2340

aggacacta cgaatgccc gcggcgact gtggtacgc tccgtcccg gaagaaga 2400

aagaagaaga agcaagaaga gaagagag aagaagag cagaccagt acgacgac 2460

gtataatgt caggcgggc cagttcccg cgcggagc atgatatag cgtttagt 2520

cggtctcaaa tcaaggtcgg ttggtctagt agtagataga tccatccaaa tgcgcgcatg 2580  
 ttgttagatc cagagctctt tcccttttac ttaagatcgg cagagctgaag ttgagatctc 2640  
 tccatagatc ttgttagattt aaaaatgatt aaaaatgatt taaatcatg 2700  
 tactctcagc taggatgatg ttctatgta acgatcttag atctcggaa cagatccat 2760  
 ttactatagg ccggctcagg gtaataag actagacaga ggcagcataa tggcgcata 2820  
 aacattcttg ttcttagcc gadttagtc aacaggttc agtagcagc aaaggttttg 2880  
 attttttt ttgttgccg tggcgcttc actgacctt actgacctt actgacctt 2940  
 cagcaatc caccctggc acgcgattt acagcttatt attactacc ttgcggaga 3000  
 caggttcata tatctctgg tcdgttaatt ttgatttca attcaaatg taaatacca 3060  
 gaaacttga ctgcaaatc tggatttct cactactcc tcaacaatt cagtgcagtc 3120  
 gtctcttg ctgagaggtt agcccaaac ccttgccgc gccatggcgg ctctgtctac 3180  
 gtccagctc gcaactccg gcaactccg gcaactccg gcaactccg gcaactccg 3240  
 ttctcagcc ctgagccccc ggaacccgc ggtgagggc ctgagccaga ggaactccg 3300  
 agcagccgc gcccaaacg aacagagaa accgaccga ttcgaccgc ggtgactctc 3360  
 catggttg cgcgcacgg gcagccggc catgaactc ggtgctgctc cgcgcacat 3420  
 ggcgccttg agcagatct ggcctcttg cgcgctctc ggcgctctc cgcgcacat 3480  
 ggcgtaagc ttgctcact gctctctt aaattttt tctcagcc atgctgccc 3540  
 ttacaacgg ttccctgtcc gtcagccga acggtcacg ggtcaggtc atctccgc 3600  
 gctacgcca gtacagagc gctcgggaca ccaggtcat ctccagagga tatccgccc 3660  
 acatgaata tcaaatcca catgctctt cacattctg caagactta ctgactggt 3720  
 ggaactcga gatcaagtc gttgacaggt acgagaggtt gaggtaactc cactgtaca 3780  
 agcgcgggtt ggcgcgctg ttgctgac

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2818

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum aestivum

&lt;400&gt; 2

gagctcatg cgtcgcagac gccaaagcgc tcaactcac ggtcgtgtgc caacacacc 60  
 tccagtagc ctgctctgct gcaacagc cgcgccaca aatcgctac gcttcagatc 120  
 gcatggcgc ttctgctgt ttgtctta attactgca ggggtcttcg atgtaccca 180  
 aagttagatg actgaaatt ctgagatga ttccaagaaa tgggtgagc aatagatga 240  
 tgcaggtgc cggatataa aatttttg agtatgagc acacacacac caggtatgt 300  
 catctactt aaatctcag agccactat taagcgttg atgttaaga cgggtatgt 360  
 ctattcgtc gttgaattc agttcaag acgttaccat ttatgacta tggatcagc 420  
 catgaatgt gatgttact gttgactca ttcattgct ctttgtct ttgtaattg 480  
 gttgaatgt gaaatttca catactaa gaaatcaca ctctaaac gtaatttct 540  
 ttgagattt tattttga acttcgctg aagggtgctg atgtccccc tattcatca 600  
 ggaactagg aaaaatag caaaaaat catacatat taaaatgat aatatgtat 660  
 agagaataat ttatcaact atagaaaaat atatgcaaaa atataaata tgtatgaat 720  
 ttttagcaa gtaattaat ctgacttg aagaataat aacaaagt tagaaaaatg 780  
 ttaacgtgt atagaaaaat gttccactg aattaaaa atattttaa atgttaata 840  
 ttttaaaaa tamccaaga ttttaaaa atattttaa atgttaata aggtattga 900  
 aaattctaa cgtgtataa aaatgtgc ccatgttta aaaaatgta atctgtatt 960  
 taaaaatga atcaagcat tagaaaaa gttaatgt atgaatgt acccagaaa 1020  
 tcttgatatt atatttcaa aatgttaata agcatttga aatatitga aatatitga 1080  
 tagaaaaat gttacacatg tattttaa attttaact tgtatttga acatgtta 1140  
 cagcttagg atataacca aatgtgat taaaataca atgaataac aagggaaacg 1200  
 aagaaaaac aatgaaac gggaaaaa caaaaaaa agaaaaaa agaaaaaa 1260  
 ttgaaaaa agaaagaa aagagaaac ggaataaac aacaaaag gaaagaaa 1320  
 gtgaaaaa tagtaaac aagaacaa gaaaaaga tgacaaca gaaaaaat 1380  
 aaaaaacg aaggaacg gtaagacg tctttctt caagtgtga ggcctacc 1440  
 aggttaaac gaactgag atgactttt ggttaggaga gtaactgg aacgagga 1500  
 tccggacca accatgtgc ctacaaagt gattattat tttkgcaa aatgacga 1560  
 atctattc aaaaatcag gaatacaaa acatctgaa cataatga aatactga 1620  
 gattcagga cccaacaa ccaactgt cgcgagaa aaggtatgg gaggacaga 1680  
 attatctaa cscgtctt cctcgtgt ttgtctcgc ggcgtctaa caactggc 1740  
 aacagaaa gcaaacagt gtcctcgt ccgcagcaa gaagacaa cgtcactgt 1800  
 cagagccgt caccacga gcaaacgtt aaggttgt cgttgtgt atccgtagt 1860  
 acgcgcaac gcatgccc caccgctt gcggtggaga gcgagggat gcatcaaca 1920  
 acaaacgac agtgcagtg cttacagtc tcatccctc caaaaaaa agttgcagt 1980

cttatctat ctattcac aatcaacgc ggctctctac tcttcgac caagcccg 2040  
 tccgtctca gttctacgt gattctgca acctcttc agcagttgt caccacggac 2100  
 gctctctgt gctgtctg cgtggacgc cccctctt ccagctgt ccgcggggc 2160  
 cggcgccga aatcgagac ccaacagcc accgcagc gggcgttg tactacacg 2220  
 cccctgtt aaagccgc cgtctgtgc cgtccccc tcgagccat ttcccggcc 2280  
 tgacccctg cgtttacc ccaagcaca ctccagcca gtcagcca ctcgcccgc 2340  
 gtaactccc actccctg ccaacact cgcctgcgc gcgtctgg cgaagacca 2400  
 acccgcat cgtaccat cgcgcgcgc cgcgcgcgc cgcctatgc tcggcggtc 2460  
 cgtccgcgc gttctctc ggcctgctt cgcctccc cggagatca cgcagcgcc 2520  
 cggaggtgag cgcgcgcca cccacgcgc gggcggcag gctgactgg ccgccttgc 2580  
 cgcgcagc caegctcgc gacgaggtg tggcgcgc ggcgcgcgc cgcagcgac 2640  
 cagaggtga cgaacgac ggtcgcga ggcagccc cgcagcgc ggtgagcgc 2700  
 cacaacagt agtgggtg ttatgctg ctgtatggc cgtgcctc gagatcagt 2760  
 cagaatgt ttctacaaa cgcacgcct cgtgtgcag tcgaggagc gaggatc 2818

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum aestivum

&lt;400&gt; 3

ctgctggaca ggataggaa

20

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum aestivum

&lt;400&gt; 4

tcgctgca gggctcctt

20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum aestivum

&lt;400&gt; 5

atggcgctc tggcagctc

20

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum aestivum

&lt;400&gt; 6

agcgccag tctgtctca

20

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Triticum aestivum

&lt;400&gt; 7

tcagtgat tctgcaacct c

21

<210> 8  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Triticum aestivum

<400> 8  
caggacggac catggggcg gccgggat

28

<210> 9  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Triticum aestivum

<400> 9  
cgccgccatg gtccgtcctg tagaaacc

29

<210> 10  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Triticum aestivum

<400> 10  
gtgatgtcag cgttgaactg c

21